

PATRÍCIA FRANCHI DE FREITAS

**CORRELAÇÃO ENTRE DISTRIBUIÇÃO DE EPHRINAS-B E
GLICOCONJUGADOS PNA-POSITIVOS E TRAJETOS MIGRATÓRIOS DE
CÉLULAS DA CRISTA NEURAL: ANÁLISE AO NÍVEL VAGAL EM EMBRIÕES DE
GALINHAS LEGHORN, E DE GALINHAS LEGHORN E SEDOSA JAPONESA AO
NÍVEL DO TRONCO**

CURITIBA

2006

PATRÍCIA FRANCHI DE FREITAS

**CORRELAÇÃO ENTRE DISTRIBUIÇÃO DE EPHRINAS-B E
GLICOCONJUGADOS PNA-POSITIVOS E TRAJETOS MIGRATÓRIOS DE
CÉLULAS DA CRISTA NEURAL: ANÁLISE AO NÍVEL VAGAL EM EMBRIÕES DE
GALINHAS LEGHORN, E DE GALINHAS LEGHORN E SEDOSA JAPONESA AO
NÍVEL DO TRONCO**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção
do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientação: **Prof^a Dr^a Cloris Ditzel Faraco**

CURITIBA

2006

Dedico esta tese

Ao Adriano e aos meus pais, Jair e Leonina,
pelo apoio em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

À Cloris, pelos exemplos de ética e humildade, e por toda paciência e amizade em todos os momentos.

Aos meus pais, Jair e Leonina, por todo amor e pelas oportunidades que me ofereceram.

Ao Adriano, em quem sempre encontrei o refúgio necessário para renovar minhas forças, pelo apoio em todos os momentos que precisei.

Às minhas irmãs, Priscila e Poliana, por compartilharem comigo este momento especial.

Às minhas amigas e companheiras do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, Cláudia, Marisa e Cristina pelo companheirismo e amizade.

À Maria Aparecida, pelo apoio e incentivo, principalmente nos momentos difíceis.

À Da Granja Agroindustrial Ltda. pela doação dos ovos de galinhas da raça Leghorn, essenciais à execução deste trabalho.

Ao Afonso Budziak, técnico do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), pelo empréstimo do equipamento *Pipette puller* (puxador de pipetas).

Ao Antonio Carlos Valomin e ao Ricardo Mickus Fujihara pelo auxílio técnico na confecção da fonte elétrica, indispensável à execução das microinjeções.

À Dra. Carol A. Erickson pela cessão de alguns materiais indispensáveis à realização deste trabalho.

À Professora Carla Wanderer pelo empréstimo do equipamento de captura de imagens de campo claro.

À Professora Sônia Regina Grotzner pela atenção durante a utilização do equipamento de captura de imagens.

À Coordenação e aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular, Marlene, Gerizalda, Ana, Nino, Eliane, e Rozalina.

Aos colegas do Programa pela convivência.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | vi |
| LISTA DE ABREVIATURAS | viii |
| RESUMO | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| CAPÍTULO 1 | |
| 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA | 01 |
| 1.1. O DESTACAMENTO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL DO TUBO NEURAL | 05 |
| 1.2. A ESPECIFICAÇÃO DA CRISTA NEURAL | 07 |
| 1.3. A MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL E OS NÍVEIS AXIAIS ... | 09 |
| 1.4. ARCOS BRANQUIAIS E CÉLULAS DA CRISTA NEURAL | 13 |
| 1.5. CRISTA NEURAL CARDÍACA | 18 |
| 1.6. CÉLULAS DA CRISTA NEURAL E TUBO DIGESTIVO | 23 |
| 1.7. AS MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL | 28 |
| 1.8. RECEPTORES Eph E SEUS LIGANTES, AS EPHRINAS | 35 |
| 1.9. MIGRAÇÃO X CRESCIMENTO DIFERENCIAL | 40 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 42 |
| 3. OBJETIVOS | 44 |
| CAPÍTULO 2 – THE DISTRIBUTION OF EPHRINS AND PNA-POSITIVE... | 46 |
| ABSTRACT | 47 |
| INTRODUCTION | 48 |
| EXPERIMENTAL PROCEDURES | 50 |
| RESULTS | 52 |
| DISCUSSION | 58 |
| ACKNOWLEDGMENTS | 63 |
| REFERENCES | 64 |
| CAPÍTULO 3 – MAPEAMENTO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL... | |
| RESUMO | 77 |
| 3.1. INTRODUÇÃO | 78 |
| 3.2. MATERIAL E MÉTODOS | 81 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.1. OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES | 81 |
| 3.2.2. INJEÇÃO DO CORANTE VITAL (DiI) POR IONTOFORESE | 81 |
| 3.2.3. IMUNODETECÇÃO DE LIGANTES EPHRINA-B | 83 |
| 3.2.4. DETECÇÃO DE GLICOCONJUGADOS PNA-POSITIVOS E CÉLULAS DERIVADAS DA CRISTA NEURAL | 84 |
| 3.3. RESULTADOS | 86 |
| 3.3.1. INJEÇÕES DE DiI E IMUNOMARCAÇÃO DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL | 86 |
| 3.3.2. DETECÇÃO DE LIGANTES EPHRINA-B E DE GLICOCONJUGADOS PNA-POSITIVOS | 88 |
| 3.4. DISCUSSÃO | 99 |
| CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS | |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 105 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 108 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| Ilustração 1- Representação esquemática do ovo de ave no momento da postura | 01 |
| Ilustração 2- Destacamento das células da crista neural durante o fechamento do tubo neural | 03 |
| Ilustração 3- Embrião de ave no estágio 17 | 09 |
| Ilustração 4- Representação esquemática de corte de embrião de ave | 10 |
| Tabela 1- Nomenclatura atual da família Eph e seus ligantes | 35 |
| Ilustração 5- Estrutura molecular dos receptores Eph e seus ligantes | 36 |
| Ilustração 6- Interação entre os membros das subclasses A e B de receptores Eph e ligantes ephrina | 38 |

CAPÍTULO 2

| | |
|--|----|
| Figure 1- Schematic drawings of individual sections comparing the migration pattern of melanoblasts of SK and WL embryos at stages 20, 24 and 28 | 69 |
| Figure 2- Sections through the thoracic level of SK embryos at stage 26 labeled with SL serum | 70 |
| Figure 3- Sections through the thoracic level of SK and WL embryos at stages 20 and 24 labeled with EphB2-Fc to determine the distribution of ephrin-Bs | 71 |
| Figure 4- Sections through the thoracic level of SK (A, B, E and F) and WL (C, D, G and H) embryos at stage 28 labeled with EphB2-Fc and PNA-FITC lectin | 72 |
| Figure 5- Sections through the thoracic level of SK (A) and WL (B) embryos at stage 28 labeled with antibody to fibronectin | 73 |
| Figure 6- Sections through the thoracic (A and C) and sacral (B and D) level of SK embryos at stages 20 and 22 labeled with EphB2-Fc | 74 |
| Figure 7- Sections through the thoracic level of SK (A, B, C, G, H and I) and WL (D, E and F) embryos at stage 28 labeled with SL serum after injection with ephrin-B1-Fc (A, D and G), PNA-FITC lectin (B, E and H) and PBS (C, F and I) | 75 |

| | |
|--|----|
| Figure 8- Sections through the thoracic level of SK embryos at stage 26-28 labeled with SL serum after injection with PNA-FITC..... | 76 |
|--|----|

CAPÍTULO 3

| | |
|---|----|
| Ilustração 1- Representação esquemática da porção anterior de embrião de ave no estágio 10 | 82 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Figura 1- Mapas esquemáticos de cortes de embriões em diferentes estágios do desenvolvimento injetados com Dil ao nível do somito 2 | 91 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Figura 2- Mapas esquemáticos de cortes de embriões em diferentes estágios do desenvolvimento injetados com Dil ao nível do somito 3 | 92 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Figura 3- Mapas esquemáticos de cortes de embriões em diferentes estágios do desenvolvimento injetados com Dil ao nível do somito 4 | 93 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Figura 4- Mapas esquemáticos de cortes de embriões em diferentes estágios do desenvolvimento injetados com Dil ao nível do somito 5 | 94 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Figura 5- Fotomicrografias de fluorescência de cortes de embriões injetados com Dil | 95 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Figura 6- Cortes histológicos ao nível vagal de embriões em diferentes estágios do desenvolvimento imunomarcados com HNK-1..... | 96 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Figura 7- Cortes histológicos ao nível vagal de embriões em diferentes estágios do desenvolvimento imunomarcados para detecção de ligantes ephrina-B | 97 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Figura 8- Cortes histológicos ao nível vagal de embriões em diferentes estágios do desenvolvimento imunomarcados com HNK-1 (rodamina) e citoquimicamente marcados com PNA (fluoresceína) | 98 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| A-CAM | - molécula de adesão celular N-caderina |
| ad | - aorta dorsal |
| ANNA-1 | - anticorpo que reconhece neurônios |
| AP | - fosfatase alcalina |
| BCIP | - 5-bromo-4-cloro-3-idolil fosfato |
| BMP | - proteína morfogenética do osso |
| BrdU | - bromodeoxiuridina |
| BSA | - soro albumina bovina |
| c | - região cardíaca |
| Ca ²⁺ | - íon cálcio |
| cc | - crista circunfaringeal |
| c-cad | - moléculas de adesão celular da família caderina |
| cfrzb | - inibidor da molécula sinalizadora Wnt |
| c-kit | - molécula receptora do fator Steel |
| cp | - cavidade pericardial |
| CSAT | - anticorpo que reconhece a subunidade $\beta 1$ de integrina de galinha |
| d | - dermatomo |
| da | - aorta dorsal |
| Dil | - 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato |
| dl | - via dorsolateral |
| drg | - gânglio de raiz dorsal |
| E/C8 | - anticorpo monoclonal que reconhece uma população de células da crista neural que migra do nível vagal para os arcos branquiais |
| EDN3 | - endotelina 3 |

| | |
|---------------|--|
| <i>Edn3</i> | - gene para endotelina 3 |
| EDNRB | - receptor B de endotelina |
| <i>Ednrb</i> | - gene para o receptor B de endotelina |
| Eph | - receptores tirosina quinases |
| <i>et al.</i> | - <i>et alli</i> |
| ET3 | - endotelina 3 |
| f | - faringe ou tubo digestivo anterior |
| FGF | - fator de crescimento de fibroblasto |
| FITC | - isotiocianato de fluoresceína |
| FN | - fibronectina |
| FoxD3 | - membro da classe de fatores de transcrição hélice-alada |
| g | - tubo digestivo |
| GalTase | - galactosiltransferase |
| GFAP | - anticorpo que reconhece células da glia |
| GFP | - proteína fluorescente verde |
| GlcNac | - N-acetilglucosamina |
| gt | - gânglio transitório de Froriep |
| HH | - Hamburger & Hamilton, 1951 |
| HNK-1 | - anticorpo monoclonal que reconhece um oligossacarídeo [sulfato-3-GlcA β (1 \rightarrow 3)Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc β (1 \rightarrow 3)Gal β (1 \rightarrow 4)Glc β (1 \rightarrow 1)-ceramida] de superfície celular de células da crista neural |
| IgG | - imunoglobulina G |
| IgM | - imunoglobulina M |
| <i>lac-z</i> | - gene repórter |
| LZ10 | - retrovírus deficiente na replicação |

| | |
|---------------|--|
| m | - miótomo |
| M | - molar |
| mM | - milimolar |
| MMP | - metaloproteinase de matriz extracelular |
| MSA | - “migration staging area” - uma região entre o tubo neural e a porção mais dorsal do somito |
| <i>msx</i> | - gene homeobox |
| n | - notocorda |
| NAPA-73 | - antígeno neuronal específico |
| NBT | - nitrobluetetrazolio |
| NC-1 | - anticorpo monoclonal que reconhece células de crista neural |
| N-CAM | - molécula de adesão celular da família caderina |
| nt | - tubo neural |
| PBS | - solução salina tamponada com fosfato |
| PDZ | - domínio carboxiterminal de receptores Eph e ligantes Ephrina-B |
| PNA | - lectina de amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>) |
| QCPN | - anticorpo que reconhece células da crista neural de codorna |
| RALDH2 | - enzima responsável pela síntese de ácido retinóico |
| <i>Raldh2</i> | - gene para a enzima RALDH2 |
| RGD | - seqüência dos aminoácidos arginina-glicina-asparagina |
| RTK | - receptor tirosina quinase |
| s | - esclerótomo |
| SAM | - domínio alfa estéril C-terminal de receptores Eph |
| SHH | - Sonic Hedgehog |
| <i>shh</i> | - gene para Sonic Hedgehog |

| | |
|--------------|--|
| SJ ou SK | - aves da raça Sedosa Japonesa |
| SL | - soro Smyth line |
| SNE | - sistema nervoso entérico |
| SOX | - fatores de transcrição |
| Sox | - gene para o fator de transcrição SOX |
| td | - tubo digestivo anterior ou faringe |
| te | - trato de efluxo do coração |
| TGF | - fator de crescimento transformante |
| TIMP | - inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz extracelular |
| tn | - tubo neural |
| TRICT | - isotiocianato de rodamina |
| v | - via ventral |
| vc | - veia cardinal anterior |
| vr | - raiz ventral |
| WL | - aves da raça Leghorn Branca |
| Wnt | - molécula sinalizadora da família de proteínas de secreção parácrina altamente conservadas que regulam interações célula-célula |
| α -LA | - alfa-lactalbumina |
| μ m | - micrômetro |

RESUMO

Ao nível vagal as células da crista neural povoam diferentes regiões no embrião em três ondas migratórias: uma dorsolateral precoce (crista circunfaringeal), uma ventral (linhagens glial e neuronal) e uma dorsolateral tardia (melanoblastos). Ao nível do tronco estas células se segregam em duas ondas: ventral (linhagens glial e neuronal) e dorsolateral (melanoblastos). Galinhas da raça Sedosa Japonesa (SJ) exibem intensa pigmentação de órgãos internos, que é resultado da dispersão atípica de melanoblastos. Muitas moléculas têm sido descritas por influenciar positiva ou negativamente a migração das células da crista neural. Ephrinas-B e glicoconjugados PNA-positivos estão presentes na porção posterior do somito, conferindo o padrão segmentado de distribuição de precursores neuronais, que usam exclusivamente a porção anterior do somito para migração. Melanoblastos parecem ser estimulados por ephrinas para seguir a via dorsolateral. Correlacionando o padrão de expressão de ephrinas e a distribuição de glicoconjugados PNA-positivos na região do tronco com a dispersão atípica de melanoblastos em embriões de SJ, é possível verificar que áreas mais ventrais, incluindo o somito posterior, expressam ephrinas num padrão que está correlacionado com caminhos livres de glicoconjugados PNA-positivos. Embriões de galinhas da raça Leghorn, usados como controle, não apresentam ephrinas em caminhos ventrais, estando estes ocupados por glicoconjugados PNA-positivos. Os resultados sugerem que ephrinas e glicoconjugados desempenham um papel combinatório, os primeiros estimulando migração de melanoblastos e sendo necessários, enquanto os outros atuariam como influência inibitória estando portanto ausentes dos caminhos seguidos por melanoblastos. Injeções pontuais do corante vital Dil ao nível vagal (do somito 2 até 5) confirmaram a ocorrência das três ondas migratórias, não sendo observadas diferenças no padrão de dispersão da crista neural entre os 4 primeiros somitos permanentes. As primeiras células seguem a via dorsolateral entre os estágios 9 e 14, e se aglomeram ao redor da veia cardinal anterior. As células que seguem a via ventral, migram entre os estágios 13 e 15 através do esclerótomo logo adjacente ao dermatomo, contornam a aorta dorsal e mais tarde se posicionam em torno da faringe. A terceira onda ocorre através da via dorsolateral e se inicia no estágio 20. Estes resultados foram confirmados com a utilização de imunomarcagem das células da crista neural com o anticorpo HNK-1. Analisando a distribuição de ligantes ephrina-B neste nível axial, é possível observar que a via dorsolateral é positiva, enquanto que o caminho ventral é negativo para estes ligantes em todos os estágios analisados (12-22). Da análise da distribuição de glicoconjugados PNA-positivos no nível vagal, observa-se que eles estão ausentes nos tempos e caminhos correspondentes a cada onda migratória, corroborando a sugestão do seu papel inibitório à migração da crista neural.

ABSTRACT

Neural crest cells at vagal level populate various embryonic regions, following three migratory waves: one early, dorsolateral (circumpharyngeal crest), one ventral (neuronal and glial lineages) and a later, dorsolateral one (melanoblasts). At trunk level neural crest cells segregate in two waves: ventral (neuronal and glial lineages) and dorsolateral (melanoblasts). Japanese Silky chicken (SK) exhibits massive pigmentation of internal organs, which is the result of atypical melanoblast dispersion. Several molecules have been described as positive or negatively influencing neural crest cells migration. Ephrins and PNA-positive glycoconjugates are present in the posterior somite, giving a segmented pattern to the distribution of neuronal precursors that use only the anterior half of the somite for migration. Melanoblasts seem to be stimulated by ephrins to follow the dorsolateral path. Correlating the expression pattern of ephrins and PNA-positive glycoconjugates distribution in trunk region with the atypical melanoblast dispersion in SK embryos, it was possible to verify that more ventral areas, including posterior somite, expressed ephrins, in a pattern that correlates to the paths free of PNA-positive glycoconjugates. Leghorn embryos, used as control, displayed no ephrin in the ventral paths that were occupied by PNA-positive glycoconjugates. From these results it is possible suggest that ephrins and glycoconjugates play a combinatory role, the first ones stimulating melanoblast migration and being necessary, while the others have an inhibitory influence and so have to be absent of the paths followed by the cells. Focal injections of the vital dye Dil at vagal level (somite 1 to 4), confirm the occurrence of three migratory waves, without differences in the dispersion pattern of neural crest between the first four somites. The first cells follow the dorsolateral path between stages 9 and 14, and agglomerate around of the anterior cardinal vein. The cells that follow the ventral path, migrate between stages 13 and 15 through the sclerotome just adjacent to the dermatome, turn to the dorsal aorta and later on are located around the pharynx. The third wave occurs through the dorsolateral path and is initiated at stage 20. These results were confirmed by immunolabeling with HNK-1 antibody. Analysing the distribution of ephrin-B ligands at this axial level, it was possible to observe that the dorsolateral path expresses the ligands, while the ventral path is negative for them at all analysed stages (12-22). Analysis of the PNA-positive glycoconjugates at vagal level, showed that they are absent of the paths at the time of each migratory wave, reinforcing the suggestion of an inhibitory role in neural crest migration.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O desenvolvimento embrionário nas aves se dá externamente ao corpo da fêmea, e para tanto deve ocorrer o acúmulo de grande quantidade de vitelo. Por esse motivo, os ovos das aves são do tipo **telolécitos**, ovos com grande quantidade de vitelo ocupando-os quase totalmente ficando a região que dará origem ao novo indivíduo, restrita a uma pequena porção da célula, denominada citoplasma ativo ou cicatrícula. A fecundação é interna e ocorre na porção mais superior do oviduto da fêmea, uma região alargada chamada de infundíbulo. A clivagem é dita **discoidal**, o que significa que apenas a região do citoplasma ativo sofrerá mitoses sucessivas, levando à formação de uma blástula em forma de disco denominada de **blastoderme** ou **blastodisco** (Ilustração 1). O processo de clivagem nas aves ocorre enquanto o ovo, que contem o embrião, ainda se encontra no interior do corpo da fêmea. Assim, quando a fêmea põe o ovo, o embrião já se encontra na fase de blastoderme (ou blástula).

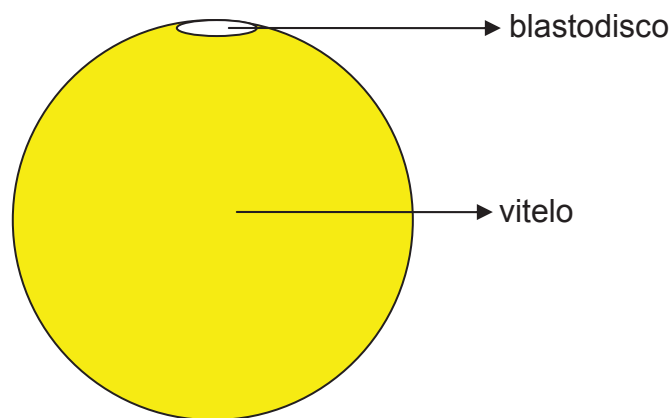


Ilustração 1

Representação esquemática do ovo de ave no momento da postura.

Após a postura do ovo, se houver o devido aquecimento, o embrião já em fase de blástula continuará seu desenvolvimento, dando início ao processo chamado **gastrulação**. A gastrulação é a fase em que ocorrem profundas mudanças na estrutura geral do embrião, tornando-o uma complexa estrutura tridimensional que já

possui seu plano corporal estabelecido. Ela se caracteriza por intensos movimentos de células e camadas celulares, que culminam com a formação dos três folhetos embrionários, **endoderme**, **mesoderme** e **ectoderme**, dos quais todos os órgãos deste novo organismo serão derivados. Da endoderme se originam o epitélio respiratório, a bexiga, o trato digestivo e seus derivados. A mesoderme dá origem ao sistema músculo-esquelético, tecidos conjuntivos e outros órgãos internos como rins e coração. Já da ectoderme se originam a epiderme, seus anexos e o sistema nervoso. Assim sendo, erros que ocorram nesta fase poderão ser fatais, o que levou o autor Lewis Wolpert à seguinte conclusão: *“It is not birth, marriage, or death, but gastrulation, which is truly the most important time in your life”*.

O desenvolvimento do embrião de ave é dito ântero-posterior, pois ao mesmo tempo em que ainda está ocorrendo a gastrulação em regiões posteriores deste embrião, tem início, na sua região anterior o próximo evento do desenvolvimento, a **neurulação**. Durante a neurulação ocorre a separação da ectoderme em dois compartimentos distintos: ectoderme de revestimento (que dará origem à epiderme e seus anexos) e ectoderme neural (que formará o sistema nervoso).

A neurulação consiste na formação de uma placa neural (que é um espessamento da ectoderme neural, através da mudança morfológica das células que a compõem) na linha média do embrião, a qual se invagina formando o sulco neural ao centro, com as **dobras** (ou pregas) **neurais** nas laterais. Esta invaginação progride até que as pregas neurais se toquem e se fundam, fechando assim um tubo que percorre todo o eixo ântero-posterior do embrião, o qual é recoberto pela ectoderme suprajacente – a ectoderme de revestimento (Ilustração 2). Este tubo é chamado de **tubo neural** e a sua porção mais anterior, localizada na região cefálica, dará origem ao **encéfalo**, enquanto que a porção posterior (o restante de sua extensão) originará a **medula espinhal**. As células contidas nas extremidades das dobras neurais irão se segregar e formar uma população distinta de células, a **crista neural**.

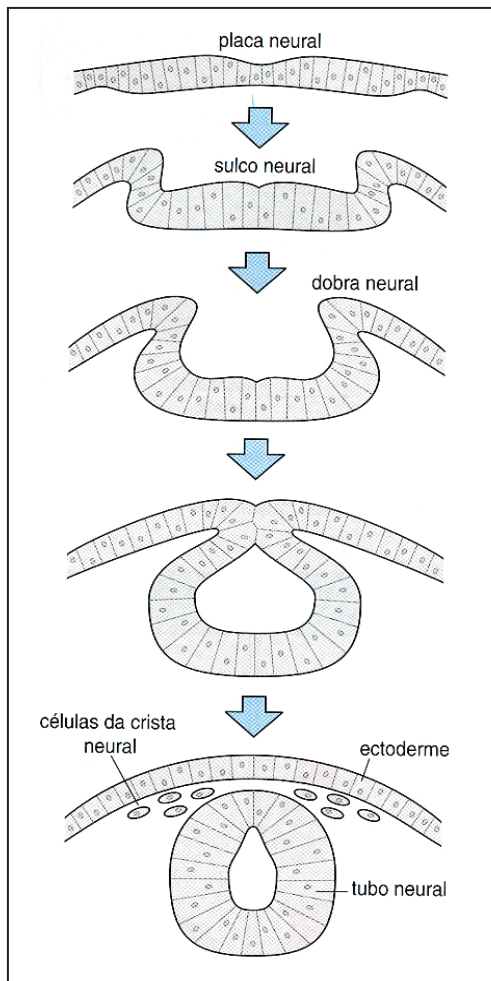


Ilustração 2

Destacamento das células da crista neural durante o fechamento do tubo neural.

Fonte: WOLPERT et al., 2000.

Esta sequência de eventos no desenvolvimento embrionário inicial é comum a todos os vertebrados, com algumas peculiaridades em cada fase, dependendo do grupo animal em questão.

As células da crista neural se soltam deste neuroepitélio através de uma transformação epitélio-mesenquimal pouco antes ou logo após o fechamento do tubo neural e iniciam sua migração, que se dá na mesma orientação ântero-posterior (BRONNER-FRASER, 1994).

Muitas vias de sinalização estão envolvidas na morfogênese da crista neural. A sinalização Notch apresenta dois papéis durante o desenvolvimento da crista neural. O primeiro é no estabelecimento do domínio da crista neural dentro da ectoderme via indução lateral, e subsequente na diversificação dos destinos de células que se originam da crista neural via inibição lateral (CORNELL & EISEN, 2005). Uma das consequências imediatas da indução da crista neural é a ativação de um grande número de genes “crista-específicos” de múltiplas famílias de

reguladores transcricionais. Entre estes, os fatores de transcrição da família SOX. Em embriões de aves, SOX 8, SOX 9, SOX 10 E LSOX 5 podem promover a formação da crista neural enquanto que SOX 2 é expresso pela placa neural prospectiva (HONG & SAINT-JEANNET, 2005).

1.1. O DESTACAMENTO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL DO TUBO NEURAL

ERICKSON (1993) relacionou hipóteses propostas na tentativa de explicar como as células da crista neural se destacam do tubo neural e iniciam sua migração. A primeira é com relação à lâmina basal que recobre a região mais dorsal do tubo neural (onde as células da crista neural se desligam do tubo neural), propondo que esta lâmina basal deve estar incompleta no momento do desligamento, por alterações causadas pelas próprias células da crista neural (por proteases), ou por ausência ou pequena produção de moléculas da matriz extracelular, formando uma lâmina basal incompleta.

A segunda proposta seria quanto ao estabelecimento de um substrato apropriado à migração das células da crista neural na região acima do tubo neural, combinada com a expressão de receptores celulares que possam interagir e aderir a esse substrato. ERICKSON & PERRIS (1993) já relataram que fibronectina, laminina, colágenos I, IV e VI, e proteoglicanos de heparam sulfato estão localizados na matriz extracelular que cobre a superfície dorsal do tubo neural antes da emigração das células da crista neural.

A terceira proposta de ERICKSON (1993) trata da geração de motilidade pelas células da crista neural. Em muitas ocasiões durante o desenvolvimento, as células são imóveis até um momento apropriado, quando então elas repentinamente iniciam a migração. Os fatores que ativam a motilidade celular nos sistemas de desenvolvimento ainda são desconhecidos, mas uma classe de moléculas, conhecidas como fatores estimulantes da motilidade, podem desempenhar um importante papel na coordenação e regulação dos movimentos morfogenéticos.

A quarta proposta diz respeito a mudanças na adesividade entre as células da crista neural e as células do epitélio neural, que parecem preceder e conseqüentemente favorecer a emigração. Moléculas de adesão como a A-CAM (N-caderina) e N-CAM parecem estar reduzidas em células pré-migratórias, podendo desencadear a migração. ERICKSON (1993) propõe também alguns mecanismos que poderiam levar a essa diminuição nas moléculas de adesão: a) regulação negativa das moléculas de adesão; b) degradação das moléculas de adesão por proteases; c) modificações bioquímicas nos ligantes de adesão que poderiam mudar a afinidade (ex.: fosforilação).

A quinta hipótese de ERICKSON (1993) é a geração de uma força tracional suficiente para puxar as células da crista neural para fora do complexo juncional (não há evidências diretas que comprovem esta hipótese).

E a sexta e última hipótese é que o plano de clivagem durante a citocinese poderia separar as células-filhas das junções apicais. Se o fuso mitótico for orientado perpendicular à superfície do epitélio, o plano de clivagem seria tal que uma das células-filhas estaria presa às vizinhas no lado voltado para a luz do tubo neural via junções aderentes, enquanto que a outra célula-filha estaria livre para migrar. Após as células da crista neural terem se destacado do epitélio neural, elas iniciam sua migração através do embrião.

1.2. A ESPECIFICAÇÃO DA CRISTA NEURAL

Por enquanto pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que regulam os processos de migração das células da crista neural. Uma hipótese, proposta por LE DOUARIN (1982; 1993), é de que as células da crista neural são multipotentes e migram ao acaso se dispersando de acordo com as condições do meio, seguindo pelos caminhos mais favoráveis e se diferenciando conforme o ambiente em que se encontram. Outra hipótese sugere que as células da crista neural assumem primeiro determinadas características e então selecionam um caminho migratório particular com base em sua especificação de desenvolvimento. Estudos recentes vêm demonstrando isto, ao nível torácico, em que células da crista neural são especificadas como precursoras de melanócitos antes de entrarem no caminho dorsolateral (ERICKSON & GOINS, 1995).

DORSKY e colaboradores (2000) em seu artigo de revisão, relataram a existência de classes de moléculas sinalizadoras que são secretadas: Wnts (moléculas sinalizadoras que podem controlar diretamente o destino celular em vertebrados e invertebrados), BMP2 e BMP4, e TGF β 1, 2, 3, as quais se mostraram suficientes para especificação de derivados particulares da crista neural. Entretanto, até agora, somente Wnts têm se mostrado necessárias para esta especificação em fases precoces do desenvolvimento. Além disso, podem existir outras moléculas ainda não conhecidas que desempenhem papéis essenciais para este processo, seja sozinhas ou combinadas com os fatores já identificados. De qualquer forma, os sinais Wnt, BMP e TGF β devem estar presentes antes que as células da crista neural iniciem sua migração, enquanto estas se encontram na chamada MSA ("migration staging area" - uma região entre o tubo neural e a porção mais dorsal do somito), para mediar a especificação do destino celular em crista neural pré-migratória.

JIN e colaboradores (2001), usando hibridização *in situ*, notaram que, embora Wnts sejam expressos no tubo neural dorsal durante o período de migração das células da crista neural, o inibidor de Wnt, cfrzb-1, é expresso por precursores gliais e neuronais e não por melanoblastos, sugerindo que Wnt pode estar envolvido na especificação da linhagem melanocítica. Estes autores também observaram que Wnt-3a adicionado ao meio de cultura aumenta muito o número de células

pigmentares em cultura de células da crista neural de codorna, enquanto que diminui o número de células neuronais e gliais, sem alterar a proliferação. Já BMP-4 é expresso no tubo neural dorsal enquanto as células da crista neural neuronais estão migrando, mas é reduzido no momento em que está ocorrendo a migração de melanoblastos, sugerindo que sinalizadores BMP podem estar envolvidos na diferenciação celular neuronal e glial ou na repressão da melanogênese. BMP-4 purificado reduz o número de células pigmentares em cultura, enquanto aumenta o número de células gliais e neuronais, também sem alterar a proliferação celular. Com estes resultados JIN e colaboradores (2001) sugerem que o sinalizador Wnt especifica melanócitos ao invés das linhagens neuronal e glial, e além disso, que Wnt e BMP têm funções antagônicas na especificação da crista neural do tronco.

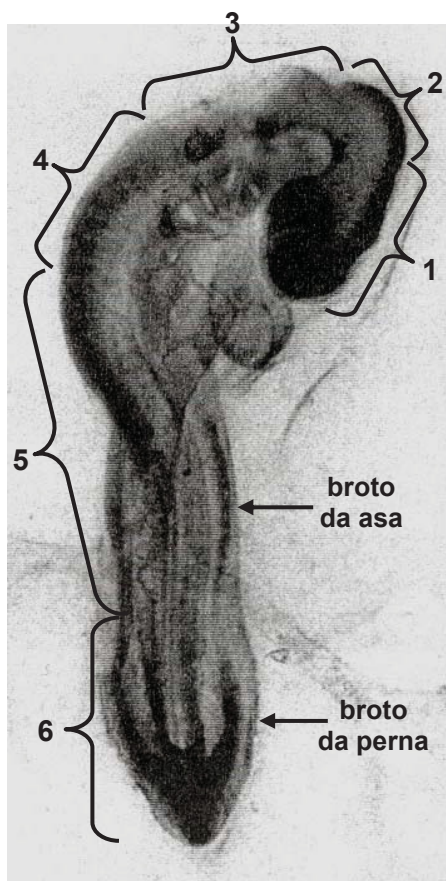
Outras moléculas têm sido citadas pelo seu envolvimento na especificação e segregação das células da crista neural, como por exemplo o FoxD3, um membro da classe de fatores de transcrição hélice-alada. KOS e colaboradores (2001) observaram que FoxD3 é expresso na região dorsal do tubo neural, sugerindo que FoxD3 pode ser importante na segregação das células do epitélio neural. Observaram também que células da crista neural melanogênicas não expressam FoxD3. Através do bloqueio da expressão de FoxD3 estes autores observaram que ocorre expansão da linhagem melanocítica, provavelmente às custas das linhagens neuronal e glial, *in vivo* e *in vitro*. Contrariamente, a persistência da expressão de FoxD3 em células da crista neural que migram tardiamente resultou na falha em desenvolver melanoblastos. Com estes resultados os autores sugerem que FoxD3, além de estar envolvido na segregação das linhagens da crista neural do neuroepitélio, reprime melanogênese, por isso permitindo que outros derivados da crista neural se diferenciem durante estágios precoces de padronização da crista neural.

1.3. A MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL E OS NÍVEIS AXIAIS

A crista neural é um modelo muito rico em se tratando de estudos em biologia celular, como por exemplo estudos de migração e diferenciação celular, pois, além de originar muitos fenótipos diferentes como neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico, células pigmentares (como melanócitos), células endócrinas e paraendócrinas, componentes conjuntivos e esqueléticos do crânio ainda, estes derivados migram através de diferentes vias e de diferentes formas dependendo do nível axial analisado (LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999).

Didaticamente costuma-se dividir a crista neural ao longo do eixo ântero-posterior em quatro regiões principais (Ilustração 3):

- crista neural cefálica, que compreende a crista localizada ao nível do diencéfalo, mesencéfalo e romboencéfalo;
- crista neural vagal, compreendendo a região entre os somitos 1 e 7;
- crista neural do tronco, desde o somito 8 até o somito 27;
- crista neural sacral, do somito 28 em diante.



- | | | |
|-------------------------|---|-------------------------|
| 1- diencéfalo | } | crista neural cefálica |
| 2- mesencéfalo | | |
| 3- romboencéfalo | | |
| 4- somitos 1 a 7 | → | crista neural vagal |
| 5- somitos 8 a 27 | → | crista neural do tronco |
| 6- somitos 28 em diante | → | crista neural sacral |

Ilustração 3

Embrião de ave no estágio 17.

Fonte: HAMBURGER & HAMILTON, 1951.

Ainda se faz referência à crista neural cardíaca que origina precursores que vão participar da septação do trato de efluxo do coração (MIYAGAWA-TOMITA *et al.*, 1991). Esta se encontra colocalizada com as cristas cefálica e vagal, se estendendo desde a região correspondente à metade da vesícula (ou placóide) ótica até a região correspondente ao somito 3 (KURATANI & KIRBY, 1991).

As células da crista neural cefálica em sua maioria, migram superficialmente aos somitômeros. Entretanto, existe uma pequena subpopulação da crista cefálica que invade a mesoderme somitomérica e vai segregar precursores miogênicos de músculos voluntários do arco visceral do mesênquima subjacente (NODEN, 1988).

Ao nível do tronco, as células da crista neural seguem dois caminhos migratórios em dois momentos diferentes. A primeira via de migração, assim que o tubo neural se fecha, é ventral, entre o tubo neural e o dermomiótomo e mais tarde através do esclerótomo (Ilustração 4). Estas células que migram ventralmente vão originar neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico e células adrenomedulares (BRONNER-FRASER, 1986; SERBEDZIJA *et al.*, 1989). A segunda onda de migração, 24 horas após a primeira, é dorsolateral, entre o somito e a ectoderme (Ilustração 4), e estas células originarão as células pigmentares, os melanócitos (HULLEY *et al.*, 1991).

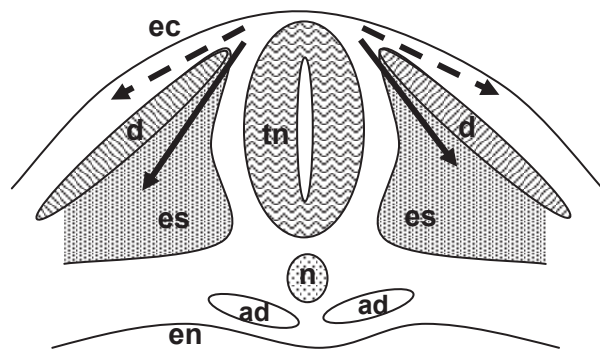


Ilustração 4

Representação esquemática de corte de embrião de ave. Seta: via ventral de migração; seta tracejada: via dorsolateral de migração; tn: tubo neural; n: notocorda; ad: aorta dorsal; es: esclerótomo; d: dermomiótomo; ec: ectoderme; en: endoderme.

Na região vagal, ocorrem três ondas migratórias diferentes. Uma primeira onda dorsolateral, uma onda intermediária ventral e uma última onda também dorsolateral (Ilustração 4). As células da primeira onda dorsolateral invadem os arcos branquiais e compõem uma população de células que não se diferenciam como melanócitos *in vitro*, tendo-se sugerido que o ambiente dos arcos branquiais não permite a sobrevivência ou diferenciação de células da crista neural melanogênicas (CIMENT & WESTON, 1985). Na última onda migratória, também dorsolateral, as células não invadem os arcos branquiais e são especificadas como melanoblastos (REEDY *et al.*, 1998). A onda migratória ventral povoa o intestino e origina os gânglios entéricos (LE DOUARIN & TEILLET, 1973).

Na região sacral, as células da crista neural migram através dos caminhos dorsolateral e ventral, e originam melanócitos e os gânglios entéricos da porção pós-umbilical do tubo digestivo (LE DOUARIN & TEILLET, 1974).

Através de cultura de tecidos foi demonstrado que o direcionamento da migração das células da crista neural é provavelmente devido à inibição por contato. Resultados obtidos de experimentos com enxertos sugerem que quimiotaxia e haptotaxia não desempenham um papel no controle do desprendimento das células da crista neural do tubo neural. A extraordinária habilidade das células da crista neural na dispersão dentro do embrião tem sido documentada, quando se realizam enxertos de células de crista neural de um local para outro onde normalmente elas não migram. Há evidência de que a produção celular de ativador de plasminogênio, uma enzima proteolítica, e também a força tracional mínima que as células da crista neural exercem sobre o substrato no qual elas migram, contribuem para esta habilidade migratória (ERICKSON, 1988).

ERICKSON e colaboradores (1980) verificaram que células da crista neural e seus derivados são altamente invasivos em seu caminho migratório normal, bem como em ambientes não familiares, sugerindo que as células da crista neural por si só apresentam habilidades migratórias especiais em tecidos embrionários. Além disso, BEUVAIS e colaboradores (1995) observaram que células do sarcoma 180 são capazes de seguir a mesma rota das células da crista neural. Então além de habilidades migratórias especiais das células da crista neural, ainda o ambiente embrionário é permissivo à migração não só de células da crista neural como

também de células transformadas que também apresentam alta motilidade e invasividade.

Estudos anteriores sugerem que receptores de adesão celular estão envolvidos no controle da migração da crista neural, os quais incluem integrina, N-CAM e caderina (revisado por ERICKSON & PERRIS, 1993). As células da crista neural expressam integrinas e usam-nas para aderir à matriz extracelular (BRONNER-FRASER, 1985; DUBAND *et al.*, 1991; LALLIER & BRONNER-FRASER, 1993).

1.4. ARCOS BRANQUIAIS E CÉLULAS DA CRISTA NEURAL

Os arcos branquiais (ou arcos faríngeos, ou viscerais) são estruturas embrionárias transitórias, em pares, que servem como as paredes lateral e ventral da faringe primitiva dos vertebrados e são contíguas com o tubo digestivo em desenvolvimento. O primeiro par de arcos (mais anteriores) está localizado imediatamente caudal à abertura oral primitiva e estes são chamados de arcos mandibulares por seu envolvimento na formação do processo mandibular (PATTEN, 1953). Eles aparecem no embrião por volta do estágio 14, juntamente com o aparecimento do próximo par de arcos, os arcos hióides. Refere-se a estes dois primeiros pares de arcos branquiais como arcos anteriores. Os arcos posteriores (3º, 4º, 5º e 6º pares) aparecem nos estágios subseqüentes, estando bem individualizados no estágio 23 (HAMBURGER & HAMILTON, 1951).

Os ossos craniofaciais de vertebrados se diferenciam de células mesenquimais originadas da crista neural cranial (metade posterior do diencéfalo, mesencéfalo e romboencéfalo) que coloniza o broto nasofrontal mediano e os primeiros arcos branquiais (revisado por CREUZET *et al.*, 2005). Deve haver uma regulação coordenada de padronização e movimentação da crista neural cranial para o desenvolvimento correto da cabeça. Para este fim mecanismos moleculares e interações de tecidos devem ser empregados. Foram propostos dois modelos para a padronização da crista neural cranial: 1) modelo da pré-padronização, em que as células são especificadas antes da emigração do tubo neural, ou 2) elas adquirem seus padrões enquanto migram através da cabeça do embrião para suas posições finais (CHAMBERS & McGONNELL, 2002). Por meio de ablações ou enxertos de regiões endodermis definidas da nêurula de ave, observou-se que a endoderme instrui as células da crista neural quanto ao tamanho, forma e posição de todos os elementos esqueléticos da face (COULY, *et al.* 2002). CREUZET e colaboradores (2005) também sugerem que a morfogênese do esqueleto craniofacial é regulada por uma “conversa” bidirecional epitélio-mesenquimal.

As células da crista neural vagal que vão para os arcos branquiais posteriores, embora não apresentem potencial melanogênico, podem se desenvolver em neurônios espontaneamente em cultura, ou podem migrar para tubos digestivos aneurais com os quais elas são cocultivadas e formam gânglio

entérico (CIMENT & WESTON, 1983). Examinando algumas propriedades fenotípicas e de desenvolvimento das células mesenquimais derivadas da crista neural dos arcos branquiais de embriões de ave, CIMENT & WESTON (1985) observaram que as células mesenquimais dos arcos branquiais posteriores expressam o antígeno neuronal específico NAPA-73 e originam neurônios, células gliais, tecido glandular e tecidos conjuntivos, enquanto que as células mesenquimais dos arcos branquiais anteriores não expressam este antígeno e produzem somente derivados do tecido conjuntivo. Sugerem então que as células mesenquimais dos arcos branquiais anteriores e posteriores compreendem diferentes tipos celulares intermediários derivados da crista neural, parcialmente restritos em seu destino final.

WALL & HOGAN (1995) estudaram a expressão de BMP-4, BMP-7, FGF-8 e SHH (Sonic Hedgehog) nos arcos branquiais de embriões de ave e propuseram possíveis papéis para estas moléculas no desenvolvimento dos arcos branquiais: BMPs podem inibir o crescimento; FGF-8 pode mediar interações entre células da crista neural migrantes, e ectoderme e endoderme, e estimular o crescimento; e SHH pode estar envolvida no estabelecimento do eixo ântero-posterior do segundo arco branquial. O balanço entre BMP e FGF pode ser o que determina o crescimento correto dos arcos branquiais.

LUMSDEN e colaboradores (1991) estudando os caminhos percorridos pela crista neural cranial, utilizando injeções de Dil (corante vital carbocianina lipofílica fluorescente) e vídeo-microscopia, observaram que os arcos branquiais 1, 2 e 3 estão cheios de células da crista neural migrantes dos rombômeros 2, 4 e 6 respectivamente, formando três fileiras de células migrando ventralmente separadas por regiões onde não há células migrando. Estas regiões correspondem aos rombômeros 3 e 5, estando estes associados com níveis aumentados de morte celular entre células da linha média dorsal, sugerindo que a crista pode ser formada nestes níveis mas é então eliminada. Gene homeobox da família *msx*, mais precisamente, o *msx-2* é expresso numa colocação precisa, momentos antes da apoptose sofrida por células da crista neural dos r3 e r5 em embriões de galinha. E quando r3 e r5 são isolados do restante do neuroepitélio, ambos produzem células de crista neural e a expressão de *msx-2* é abolida, sugerindo que deve haver uma interação dentro do neuroepitélio. Assim, deve haver uma correlação entre *msx-2* e a programação da apoptose neste sistema (GRAHAM *et al.*, 1993).

Os genes homeobox *msx-1* e *msx-2* estão envolvidos em muitas desordens que afetam o desenvolvimento craniofacial em humanos. Camundongos mutantes para *msx1/2* exibem profundas deficiências no desenvolvimento de estruturas derivadas da crista neural cranial e cardíaca, dentre elas gânglios e nervos craniais hipoplásicos e padronizados erroneamente, hipoplasia de derivados dos arcos faríngeos e organização anormal de estruturas conotrunciais no desenvolvimento do coração. Nestes embriões mutantes foram observados retardo na migração de subpopulações de células da crista neural cranial e vagal e mistura das células de crista neural de diferentes subpopulações. Além disso, a expressão de marcadores do encéfalo posterior (Krox20 e EphA4) foi alterada, sugerindo que defeitos em populações da crista neural possa ser resultado, em parte, de defeitos na identidade dos rombômeros. Também foi observado aumento na expressão de BMP-4 por células migratórias da crista neural cranial e dos arcos faríngeos. E finalmente, notou-se que a proliferação do mesênquima derivado da crista neural não foi alterada, porém o número de células apoptóticas foi substancialmente aumentado, podendo contribuir para a hipoplasia observada em gânglios e nervos craniais e em derivados dos arcos faríngeos (ISHII *et al.*, 2005).

Entretanto, existe a observação de que as células da crista neural cranial emergem ao longo da linha média dorsal de todos os rombômeros, e aos níveis dos rombômeros 3 e 5 as células da crista neural migram em direção caudal ou rostral para se unir com as células migrantes existentes adjacentes aos rombômeros 2, 4 ou 6. Além disso, elas se misturam nas regiões de divisa entre um rombômero e outro, e apresentam uma grande diversidade de comportamento de migração dentro das diferentes subregiões da crista neural cranial, sugerindo que fatores de influência podem variar espacialmente ao longo do eixo rostrocaudal na região da cabeça (KULESA & FRASER, 1998). O padrão de migração das células da crista neural no encéfalo posterior (romboencéfalo) emerge dinamicamente, com a comunicação célula-célula desempenhando um papel importante no seu direcionamento (KULESA & FRASER, 2000).

ITO & SIEBER-BLUM (1993), investigaram por análises clonais *in vitro*, os potenciais de desenvolvimento das células mesenquimais do arco faríngeo posterior, as quais em sua maioria consistiam de células pós-migratórias da crista neural rombocefálica posterior, e observaram quatro tipos distintos de clones, e as células

dentro destes clones expressaram fenótipos característicos. Os clones DP (densely polygonal cells) consistiam de células poligonais densamente aglomeradas, com grandes células achatadas localizadas predominantemente na periferia destes clones. Análises de imunohistoquímica mostraram que os clones DP contêm células musculares lisas, células do tecido conjuntivo, condrócitos, e neurônios serotonina (5-HT)-positivos, e que mais de 90% de células/clone foram HNK-1-positivas, sugerindo que as células formadoras destes clones são células derivadas da crista neural pluripotentes com a capacidade de se desenvolver em derivados ectomesenquimais e neurônios serotonérgicos. Os clones DS (densely spindle-shaped cells) consistiam de células alongadas densamente aglomeradas, incluindo células musculares lisas, células do tecido conjuntivo e condrócitos, não sendo observados fenótipos neuronais, apresentando uma média de 0,4% de células/clone HNK-1-positivas, parecendo serem estes clones formados por células derivadas da crista neural que são parcialmente restritas, expressando somente fenótipos ectomesenquimais. Os clones DF (flattened large cells) consistiam de pequenas células densamente aglomeradas e células grandes achatadas. Embora não sendo células HNK-1-positivas, estes clones continham células do tecido conjuntivo e/ou células musculares lisas, parecendo serem derivados de células bipotentes. Os clones LF (loosely arranged flattened large cells) consistiam de células grandes achatadas e frouxamente arranjadas, não HNK-1-positivas, sendo estes clones formados por precursores comprometidos com a linhagem de células musculares lisas. Estes resultados sugerem um padrão característico de segregação de linhagens durante o desenvolvimento da crista neural romboencefálica posterior, indicando que a especificação de alguns tipos celulares pode ocorrer nos locais finais de localização das células da crista neural.

Com o objetivo de examinar possíveis alterações no comportamento migratório e/ou na expressão gênica de populações da crista neural rostral e caudal à região onde a porção dorsal do encéfalo posterior foi removida por procedimento cirúrgico, SALDIVAR e colaboradores (1997) demonstraram que células da crista neural dos níveis vizinhos do tubo neural podem ajustar suas trajetórias migratórias para compensar a perda de populações da crista neural e subseqüentemente se diferenciam em estruturas craniofaciais apropriadas às suas novas localizações, sugerindo que a especificação regional ao longo do eixo neural pode não ser

absoluta, mas pode ser guiada por influências ambientais ao menos em pequenas distâncias. Estas influências podem ser emanadas da mesoderme adjacente, da crista/tubo neural vizinho e/ou da ectoderme.

1.5. CRISTA NEURAL CARDÍACA

Uma população de células da crista neural, com características de transição entre a crista neural cranial e do tronco, recebeu a denominação de crista cardíaca por sua participação na septação do trato de efluxo do coração. Esta população segrega da região do tubo neural localizada entre a linha média da vesícula ótica e somito 3 (KIRBY & WALDO, 1990). As células da crista neural cardíaca migram dorsolateralmente e ventrolateralmente. As primeiras células (que migram dorsolateralmente) param temporariamente no aspecto dorsal do corno pericardial dorsal, dentro da parede lateral do corpo, formando um grupo consolidado e distinto de células. Por sua localização ao redor da faringe primitiva, esta subpopulação recebeu a denominação de crista circunfaringeal. À medida que as bolsas faríngeas se expandem lateralmente e a cavidade pericardial recua ventralmente, as células da crista circunfaringeal se movem para povoar o ectomesênquima faríngeo. Uma linha de células da crista neural, chamada de trato anterior, parte do nível medial da vesícula ótica e termina na crista circunfaringeal. No estágio 14 (HH), ao nível dos somitos occipitais, observa-se a migração ventrolateral de células da crista neural na metade anterior de cada somito. Algumas destas células estão contínuas com a porção caudal da crista circunfaringeal e nota-se uma contribuição precoce ao sistema nervoso entérico nesta região. No estágio 16 (HH) aparece uma outra linha de células dorsal à crista circunfaringeal, chamada trato posterior, formando um caminho em forma de arco ao longo da borda anterior do segundo somito (KURATANI & KIRBY, 1991).

Células da crista neural que partem da região compreendida entre o nível medial da vesícula ótica e o limite rostral do somito 1 povoam o terceiro arco faríngeo, enquanto que as células migrantes do nível dos somitos 1 e 2 ocupam o quarto arco faríngeo (NODEN, 1983). As células da região faríngeal são capazes de se desenvolver em ectomesênquima e elementos neuronais. As células ectomesenquimais limitam sua distribuição aos derivados do aparato faríngeo e trato de efluxo do coração, enquanto que os elementos neuronais contribuem a estas áreas e aos sistemas pulmonar e gastrointestinal (MIYAGAWA-TOMITA *et al.*, 1991).

Por volta do estágio 18 (HH), como resultado da formação do sistema de arcos faríngeos, surge um sulco na superfície do embrião que circunda os arcos faríngeos 3 e 4, o sulco circunfaringeal. Este sulco é preenchido por células da crista cardíaca que são reconhecidas pelos anticorpos E/C8 e HNK-1. As células E/C8-positivas estão contínuas com o ectomesênquima faringeal posterior à vesícula ótica (arcos 3 e 4), células da crista entérica e células ao redor do nervo hipoglossal. A massa de células da crista circunfaringeal é segmentada ântero-posteriormente durante a formação dos arcos faríngeos. Desta forma, a porção mais caudal da população de células, as células de crista entérica E/C8-positivas, espalha-se na parede do tubo digestivo ao nível caudal do ectomesênquima do último arco faríngeo formado. As células neuronais entéricas parecem constituir duas populações de células, uma ventrolateral HNK-1-positiva, e outra derivada da crista circunfaringeal, que é E/C8-positiva. Na porção proximal do tubo digestivo, as células HNK-1-positivas localizam-se sobre o aspecto dorsal, enquanto que as E/C8-positivas estão localizadas no aspecto lateral do tubo digestivo. Esta distribuição complementar parece estar correlacionada com os caminhos de migração iniciais destas populações. A distribuição das células da crista circunfaringeal e de seus derivados coincide com a distribuição dos ramos periféricos dos nervos craniais IX, X e XII, cujo desenvolvimento é seletivamente afetado na ausência da crista cardíaca, a fonte da crista circunfaringeal (KURATANI & KIRBY, 1992).

Os processos que envolvem migração e distribuição das células da crista neural dependem muito da arquitetura do embrião. Ao nível anterior à vesícula ótica (pré-ótica), onde não existem somitos, as células da crista neural migram adjacentes aos rombômeros de números pares (r2, r4, r6, r8), estabelecendo assim um padrão metamérico de morfogênese de raízes nervosas periféricas baseado em arcos faríngeos, denominado braquimerismo. Entretanto, na região posterior à vesícula ótica (pós-ótica) somitos e arcos faríngeos coexistem, e os nervos espinhais se segmentam metamericamente, ou seja baseados em somitos, sempre ocupando apenas a porção anterior de cada somito (KURATANI, 1997).

Além da participação na septação do trato de efluxo do coração, a crista neural cardíaca contribui para a padronização das grandes artérias. Se a crista neural cardíaca é deletada de embriões de codorna entre os estágios 13 e 18 (HH), seu arco aórtico arterial forma sua luz, porém não se separa da endoderme

faríngea, indicando que crista neural não é necessária para a sua formação precoce. No dia embrionário 3, ocorrem conexões anormais com a aorta dorsal, e perda da simetria bilateral, sugerindo que a falta do ectomesênquima derivado da crista neural desestabiliza a artéria nascente. Então é sugerido que a crista neural cardíaca é essencial para a persistência do arco arterial, mas não para sua formação. E mudanças no desenvolvimento do arco arterial são observadas antes da formação da túnica média, sugerindo que existe um período crítico no desenvolvimento do arco arterial, após a formação de sua luz, mas antes da formação da túnica média, em que a presença da crista neural cardíaca se faz necessária (WALDO *et al.*, 1996).

Quando é realizada a ablação da crista neural cardíaca, seguida da marcação com corante vital Dil da porção ventral remanescente do tubo neural, antes do estágio de 5 somitos, poucas células da crista neural cardíaca são regeneradas. Entretanto, se a ablação é realizada após o estágio de 6 somitos, nada é regenerado, não existindo resposta compensatória de regiões adjacentes da crista neural. Observa-se que células da crista neural que migram ventralmente também não se regeneram, enquanto que melanócitos, que migram dorsolateralmente, craniais e caudais à região da ablação migram radialmente e preenchem a região da ablação, não havendo interrupção do padrão normal de pigmentação (SUZUKI & KIRBY, 1997).

Células da crista neural sempre foram descritas emigrando apenas da porção dorsal do tubo neural (LE DOUARIN & TEILLET, 1973; 1974; KURATANI & KIRBY, 1991; 1992; LE DOUARIN e KALCHEIM, 1999; entre outros). Recentes estudos (SOHAL *et al.*, 1998) têm sugerido que um outro grupo de células que emigram do lado ventral do tubo neural ao nível do encéfalo posterior também contribuem para o desenvolvimento do sistema cardiovascular. Entretanto, mesmo com o uso de técnicas como injeção de retrovírus que expressa o gene repórter *lacZ* na luz do encéfalo posterior e tubo neural ao nível dos somitos 10-12 e construção de quimeras codorna-galinha, não se observa contribuição de células do tubo neural ventral para o desenvolvimento do sistema cardiovascular durante o desenvolvimento normal (BOOT *et al.*, 2003). Além disso, pode-se observar que, em contraste a estudos anteriores que descreviam a janela de emigração das células da crista neural cardíaca entre os estágios 9 e 11 (HH) (TOSNEY, 1982), foi observada

migração da crista cardíaca em embriões injetados com retrovírus *lacZ* no estágio 12 (HH), poucas células marcadas em menos de 20% dos embriões injetados no estágio 13⁻ (HH) e nenhuma célula marcada em embriões injetados no estágio 13⁺ (HH). Assim sendo, sugere-se que a janela de tempo de emigração das células da crista neural cardíaca ocorre desde o estágio 9 até 13⁻ (HH) (BOOT *et al.*, 2003).

Influências ambientais que perturbam o desenvolvimento da crista neural cardíaca causam defeitos cardíacos congênitos em animais de laboratório e humanos. Plexina A2 é expressa por células da crista neural cardíaca em migração e pós-migratórias em camundongos. Plexinas funcionam como co-receptores para moléculas de sinalização semaphorinas, e fazem mediação de direcionamento axonal. Células da crista neural cardíaca que não expressam Plexina A2 estão padronizadas de maneira anormal em muitas linhagens de camundongos mutantes com doenças cardíacas congênitas, incluindo aquelas em que falta a secreção de Semaphorina 3C, sugerindo que possa existir um paralelo entre a sinalização por semaphorinas/plexinas e a padronização da crista neural cardíaca (BROWN *et al.*, 2001).

Camundongos transgênicos e nulos para $\alpha 1$ conexina revelam que junções tipo Gap são importantes no desenvolvimento cardíaco, envolvendo a modulação da migração e da função das células da crista neural. Acredita-se que segundos mensageiros químicos, originados de cascatas de sinalização celular disparadas por interações receptor-ligante na superfície celular, possam se mover entre as células da crista neural que migram em linhas via canais juncionais do tipo Gap, e que isso possa servir para coordenar a migração, diferenciação, e/ou proliferação das células da crista neural cardíaca (LO *et al.*, 1999).

Metaloproteinases de matriz (MMPs) são mediadores importantes na migração das células de crista neural. Possuem inibidores endógenos que regulam sua atividade enzimática (“tissue inhibitor of metalloproteinase”, TIMP). Através de hibridização *in situ* observa-se que TIMP-2 é expresso no estágio 11 (HH) no neuroepitélio e somente em células da crista neural cardíaca em migração, e que TIMP-3 é expresso somente na notocorda no estágio 8 (HH) e mais tarde no trato de efluxo do miocárdio (CANTEMIR *et al.*, 2004).

Camundongos nulos para *sonic hedgehog* (*shh*) apresentam defeitos na padronização dos arcos faríngeos, com conseqüentes defeitos craniofaciais, bem

como defeitos no sistema cardiovascular. Os defeitos do sistema cardiovascular lembram uma forma severa da malformação congênita humana observada na síndrome tetralogia de Fallot, com completa atresia da artéria pulmonar. Existe a sugestão de que SHH não atua diretamente sobre as células da crista neural, mas sim em domínios restritos que as células da crista neural podem povoar durante estágios precoces (dias embrionários 8.5 a 10.5) do desenvolvimento cardiovascular e craniofacial (SMOAK *et al.*, 2005).

Em embriões de camundongo geneticamente mosaico para N-caderina é possível observar que ocorre a migração e chegada das células da crista neural na região do trato de efluxo do coração. Entretanto estas células não são capazes de sofrerem as mudanças morfogênicas normais associadas com o remodelamento do trato de efluxo. Também foi possível observar que a perda de N-caderina no epicárdio leva à interrupção nas interações celulares heterotípicas entre epicárdio e miocárdio, resultando num miocárdio ventricular delgado. Além disto, a rotação do trato de efluxo é incompleta, sugerindo que o alinhamento dos canais é dependente de forças do citoesqueleto geradas por N-caderina. Então, além do seu papel na adesão celular do miocárdio, N-caderina é necessária para rearranjos críticos das células da crista neural para a padronização do trato de efluxo e na manutenção de interações celulares entre epicárdio e miocárdio (LUO *et al.*, 2006).

Tem-se especulado a possibilidade de a crista cardíaca também contribuir para o miocárdio e epicárdio. Dados para esta especulação vêm de resultados inesperados obtidos com o uso de animais transgênicos, em que doenças cardíacas congênitas são criadas artificialmente para o estudo da crista neural cardíaca. Nota-se que existe uma relação entre estas doenças envolvendo o trato de efluxo e a deficiência na diferenciação de tecido muscular (STOLLER & EPSTEIN, 2005).

1.6. CÉLULAS DA CRISTA NEURAL E TUBO DIGESTIVO

Células da crista neural das regiões vagal e sacral alcançam o intestino, participando da formação dos gânglios entéricos, enquanto que células da crista neural da região do tronco não alcançam regiões mais ventrais (LE DOUARIN & TEILLET, 1973; DE FREITAS *et al.*, 2003). TUCKER e colaboradores (1986) usando os anticorpos monoclonais NC-1 e E/C8, que reconhecem uma população de células da crista neural, no momento em que elas migram do nível vagal do tubo neural e colonizam a região dos arcos branquiais de embriões de galinha de 2 e 3 dias, observaram que algumas das células imunorreativas parecem entrar no mesênquima do tubo digestivo no terceiro dia de incubação pela porção caudal à 3ª. fenda branquial. Após entrar no tubo digestivo, estas células migram numa direção rostro-caudal, usando primeiro o epitélio mesodermal esplâncnico superficial do tubo digestivo como substrato, onde a maioria destas células permanece associada com a esplancnopleura. Nos níveis anteriores poucas delas entram no mesênquima ao redor da endoderme enquanto que próximo à região umbilical elas são encontradas por todo o mesênquima, e nos níveis pós-umbilicais estão distribuídas em ambos os lados da camada muscular em diferenciação, mas não dentro desta. Estes autores analisaram também se a distribuição de fibronectina está relacionada com a localização das células imunorreativas, e observaram que, embora a fibronectina possa ser encontrada em toda a parede do tubo digestivo, não existe relação aparente dela com a localização das células. Com estes resultados os autores sugerem que um mecanismo mais complexo que a mera interação com fibronectina possa contar para migração das células derivadas da crista neural para o tubo digestivo.

O envolvimento de outras moléculas nesta diferença no comportamento migratório observado para as duas subpopulações de células (vagal e do tronco) tem sido estudado. Foi observado que Slit2 é expressa pelo mesênquima da entrada do tubo digestivo, e que receptores Robo para Slit2 são expressos por células da crista neural do tronco e não por células da região vagal, sendo, a resposta destas duas subpopulações diferentes quando colocadas na presença de células ou membranas celulares que expressam Slit2: células da crista neural do tronco evitam tais membranas, enquanto que células da região vagal não as evitam. Isto sugere que

Slit2 pode contribuir para esta capacidade diferenciada de populações da crista neural invadirem e inervarem o tubo digestivo. Além disto, foi observado ainda que a exposição a Slit2 solúvel aumenta significativamente a distância percorrida por células da crista neural do tronco, sugerindo que Slit2 pode apresentar duplo papel na motilidade (repelindo ou estimulando) de células da crista neural do tronco (DE BELLARD *et al.*, 2003).

Com o uso de camundongos mutantes duplos para *Sox10/Ednrb* e *Sox10/Edn3* foi possível analisar as interações genéticas entre as moléculas SOX10, endotelina-3 e EDNRB durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso Entérico (SNE) e de melanócitos. Para que o desenvolvimento destas estruturas transcorra normalmente, deve existir uma interação coordenada e balanceada entre estas moléculas (STANCHINA *et al.*, 2006). Estes mutantes duplos apresentaram aumento na quantidade e tamanho de manchas brancas na pelagem e defeitos severos no SNE.

Resultados obtidos através de remoção de diferentes segmentos da crista neural vagal, sugerem que a inervação do intestino posterior *in vivo* depende especificamente da crista neural adjacente aos somitos 3-5, enquanto que a inervação do intestino médio pode ser originada por todos os segmentos dentro da crista neural vagal e o intestino anterior pode ser inervado também por células de origem fora da crista neural vagal (PETERS-VAN DER SANDEN *et al.*, 1993). ROTHMAN e colaboradores (1990) fizeram enxertos de segmentos de intestino de embriões de codorna no quarto dia do desenvolvimento entre os somitos e o tubo neural na região do tronco de embriões hospedeiros de galinha no segundo dia do desenvolvimento. Observaram que células da crista neural (imunomarcadas com anticorpo monoclonal NC-1 específico) são capazes de migrar para fora dos segmentos de intestino enxertados e colonizar tubo neural, raiz espinhal e gânglios, nervos periféricos, gânglio simpático e adrenais do embrião hospedeiro. As células do enxerto não migram para o tubo digestivo do embrião hospedeiro e nem produzem pigmento. Estes autores concluíram então que as células derivadas da crista neural, mesmo após já terem inervado o tubo digestivo ainda são capazes de migrar e ainda são multipotentes.

Com o uso do corante vital Dil e retrovírus LZ10 injetados entre tubo neural e ectoderme (antes da migração das células da crista neural) nas regiões vagal, tronco

e sacral, foi confirmado que as células da crista neural vagal povoam a região anterior do tubo digestivo, sendo encontradas na moela e duodeno. Células da crista neural do tronco não foram encontradas no tubo digestivo, mas foram observadas no gânglio simpático e no gânglio da raiz dorsal, enquanto que as células da crista neural sacral povoam o tubo digestivo pós-umbilical e gânglio de Remak (POMERANZ *et al.*, 1991). ROTHMAN e colaboradores (1993) transplantaram células derivadas da crista neural vagal e sacral que já haviam colonizado o intestino anterior, para seus caminhos migratórios iniciais em embriões mais precoces, e observaram que estas células são capazes de migrar novamente através de caminhos definidos da crista neural nestes embriões hospedeiros.

EPSTEIN e colaboradores (1994) avaliaram a contribuição de diferentes regiões da crista neural vagal para o Sistema Nervoso Entérico, marcando células da crista neural por injeções entre os somitos 1-10 com o vírus vetor da necrose de baço deficiente na replicação, o qual contém o gene marcador *lacZ*. Após incubação em X-gal, células *lacZ*-positivas foram encontradas na parede do tubo digestivo em três locais: a maioria foi encontrada à margem periférica do músculo circular em desenvolvimento e dentro da submucosa em desenvolvimento, locais característicos de desenvolvimento de gânglio. Estas células *lacZ*-positivas nestes locais gangliônicos foram também imunomarcadas pelo HNK-1 confirmando sua origem na crista neural. Células *lacZ*-positivas foram também vistas na camada de músculo circular do esôfago e papo, e estavam separadas dos elementos gangliônicos HNK-1-positivos, sendo estas células provavelmente células musculares derivadas de células mesodermis marcadas do somito. As injeções ao nível dos somitos 3, 4, 5 e 6 resultaram numa maior porcentagem de preparações com células derivadas da crista neural *lacZ*-positivas e no maior número de células positivas no tubo digestivo, sendo estas células encontradas em todas as regiões do tubo digestivo, do proventrículo ao reto. Poucas células positivas derivadas da crista neural foram encontradas no esôfago. As injeções em somitos 1, 2 e 7 resultaram numa menor porcentagem de preparações com células positivas derivadas da crista, e nestas preparações, o número de células positivas também foi menor, e estas estavam restritas ao tubo digestivo anterior e médio. A moela foi a região do tubo digestivo que mais freqüentemente continha células marcadas, e o reto a que menos freqüentemente continha estas células, sugerindo que o número de células da crista

neural avaliável para colonização do tubo digestivo decresce conforme a distância em relação à moela aumenta. Com estes resultados os autores concluíram que a região do neuroeixo entre somitos 3-6 é a principal fonte de células da crista neural para o tubo digestivo e que células da crista neural de diferentes segmentos do neuroeixo não parecem ser segregadas para diferentes regiões do tubo digestivo.

BURNS & LE DOUARIN (1998), através de enxertos quimera codorna/galinha em conjunto com marcação por anticorpos para identificar células derivadas do enxerto (QCPN), neurônios (ANNA-1) e glia (GFAP), mostraram que células da crista neural vagal e sacral seguem caminhos precisos dentro do tubo digestivo em desenvolvimento durante o povoamento deste. As células da crista neural vagal migram numa direção próximo-distal (ou rostro-caudal), colonizando todo o comprimento do tubo digestivo, enquanto que células da crista neural sacral migram numa direção distal-proximal (ou caudal-rostral) formando o nervo de Remak e contribuindo com neurônios e glia do Sistema Nervoso Entérico, distal ao umbigo. Além disso, os mesmos autores mostraram que o colo-retó é povoado de modo complexo por células derivadas da crista vagal que primeiro colonizam a região da submucosa, então migram por fora através da camada muscular circular para a região do plexo mientérico. Já as células da crista neural sacral entram no colo-retó externas à camada de músculo circular ao nível do plexo mientérico e subseqüentemente migram para dentro do gânglio submucosal. Assim sendo, dentro do colo-retó, células de duas regiões distintas da crista neural migram em direções opostas para formar o gânglio entérico.

BURNS e colaboradores (2000), através de remoção de diferentes segmentos da crista neural vagal, observaram que precursores derivados da crista neural sacral colonizam o intestino em número significativo somente quatro dias após as células derivadas da crista neural vagal terem completado sua migração ao longo de todo o intestino. Isto sugere que o destino da subpopulação de células da crista neural sacral pode ser predeterminado pela necessidade da presença de precursores entéricos derivados da crista neural vagal como uma condição para colonizar o intestino posterior, sendo estes capazes de alterar dramaticamente a proliferação ou diferenciação das células de origem sacral. Estes autores sugerem ainda que esta interdependência pode também explicar a inabilidade de células da crista neural sacral em compensar a falta de gânglio na região terminal do intestino posterior na

doença de Hirschsprung em humanos ou no megacolon agangliônico em animais. GERSHON e colaboradores (1993), através de imunohistoquímica, observaram que uma superabundância de laminina desenvolve uma região agangliônica do tubo digestivo em camundongos mutantes *ls/ls* e está associada com a incapacidade de células derivadas da crista neural para colonizar esta região do tubo digestivo, conduzindo à hipótese de que a laminina promove a diferenciação das células da crista neural em neurônios entéricos. A expressão prematura de um fenótipo neuronal pode causar encerramento da migração das células da crista neural antes que elas completem a colonização do tubo digestivo.

ERICKSON & GOINS (2000), através de transplantes de células cultivadas com marcação fluorescente (fluor-gold), mostraram que células da crista neural sacral, quando enxertadas na região do tronco, migram até o mesentério dorsal e não entram no intestino. Já células dos níveis sacral e torácico, quando enxertados no nível sacral, alcançam o mesênquima do intestino. Concluíram, então, que células da crista neural sacral não apresentam propriedades migratórias especiais que lhes permitam alcançar o intestino, e sim que o ambiente aos níveis vagal e sacral é condutivo para alcançar o intestino e que células da crista neural de todos os níveis axiais são responsivas a estes fatores ambientais. Em contraste à migração de melanoblastos, cuja migração por caminhos apropriados é dependente da especificação anterior da linhagem e propriedades migratórias próprias desta linhagem (ERICKSON & REEDY, 1998).

Embriões de camundongo nulos para a enzima RALDH2 (*Raldh2*^{-/-}) que é responsável pela síntese de ácido retinóico, apresentam defeitos congênitos como a não septação do trato de efluxo do coração e completa ausência de gânglios entéricos (semelhante à observada na doença de Hirschsprung em humanos) levando-os à morte logo após o nascimento. A falta desta enzima causa falha na migração de células da crista neural (NIEDERREITHER *et al.*, 2003).

1.7. AS MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL

Diferentes moléculas de superfície celular e da matriz extracelular estão distribuídas ao longo dos caminhos migratórios das células da crista neural, formando um substrato que pode permitir a migração ou desempenhar um papel inibitório, impedindo que células da crista neural entrem em determinadas áreas do embrião. Moléculas como colágeno, fibronectina e glicosaminoglicanos sulfatados podem atuar como substrato que influenciam a motilidade da crista neural *in vitro*, na ausência de soro (ERICKSON & TURLEY, 1983). Estes autores observaram que se condroitin sulfato for adicionado ao meio de cultura (seja com fibronectina, com colágeno ou com fibronectina e colágeno) as células da crista neural se tornam arredondadas, sugerindo um decréscimo na adesão célula-substrato. Entretanto este polímero não reduz significativamente nem estimula a velocidade dos movimentos das células da crista neural em cultivo. Já hialuronato apresentou pequeno efeito sobre a morfologia das células quando adicionado para adsorver com fibronectina ou fibronectina e colágeno, mas causou uma redução marcante na velocidade de movimentos, podendo indicar redução na adesão celular. É possível que hialuronato reduza a velocidade de movimentos devido a efeitos na viscosidade do meio. Estes autores ainda observaram que a atração das células da crista neural ao condroitin sulfato é mediada em parte pelo hialuronato sobre a superfície da célula da crista. Evidência para isto vem de experimentos nos quais hialuronidase de *Streptomyces* reduziu a atração das células da crista ao condroitin sulfato mas aumentou a atração a fibronectina, sugerindo que hialuronato da superfície celular pode ligar ao condroitin sulfato mas cobrir moléculas ligantes a fibronectina na superfície celular. Baseado nesses resultados, é razoável especular que fibronectina é a molécula primária para a qual células da crista neural são atraídas e se movem *in vivo*, e que a alta concentração desta molécula ao longo do caminho migratório é crucial na determinação do caminho que as células da crista neural vão seguir.

Por imunohistoquímica e hibridização *in situ*, foram examinados a distribuição e o provável papel dos dois principais proteoglicanos ligados a hialuronana, PG-M/versicam e agrecam, durante o desenvolvimento da crista neural de ave, e os dados observados sugerem que estas moléculas notocordais exercem funções de

direcionamento divergentes durante a dispersão das células da crista neural, as quais são mediadas por suas proteínas centrais e suas cadeias laterais de glicosaminoglicanos, e podem envolver fenômeno de motilidade semelhante a haptotactismo. Enquanto *agrecam* define áreas embrionárias estritamente impenetráveis, PG-M/versicans são componentes principais dos caminhos migratórios das células da crista neural favorecendo os movimentos direcionados das células (PERISSINOTTO *et al.*, 2000).

NAKAGAWA & TAKEICHI (1995) identificaram duas caderinas, c-cad6B e c-cad7, que são expressas por células da crista neural em seus estágios pré-migratório e migratório, respectivamente, em embriões de ave, sendo ambas moléculas de adesão homofílica (entre células de mesma linhagem), prendendo células com adesividade específica. Estes autores constataram que durante o desenvolvimento, c-cad6B apareceu nas células das pregas neurais, estando localizada na área da futura crista neural. Esta expressão foi mantida durante o fechamento do tubo neural, mas desapareceu após as células da crista neural terem partido do tubo neural, sugerindo seu papel na fusão das pregas neurais e/ou na formação e manutenção do futuro domínio da crista neural na placa/tubo neural. As células de crista neural que partem do tubo neural param de expressar c-cad6B, e uma subpopulação delas começa a expressar c-cad7, expressão que continua durante sua migração. Estas células expressando c-cad7 migram agrupadas e vão povoar os gânglios da raiz ventral e dorsal. Com estes resultados, os autores sugerem que as células migrantes são agrupadas dentro de subpopulações expressando diferentes caderinas.

Células embrionárias migrantes apresentam altos níveis de atividade galactosiltransferase (GalTase) na superfície celular, sendo assim proposto que GalTase participa na migração por reconhecer e ligar-se a resíduos terminais N-acetilglucosamina (GlcNac) sobre glicoconjugados da matriz extracelular (SHUR, 1982). Posteriormente, esta atividade foi testada em cultivo de células da crista neural, usando a proteína GalTase modificada, α -lactalbumina (α -LA), para inibir GalTase de superfície de ligar aos resíduos terminais GlcNac em substratos delineados (RUNYAN *et al.*, 1986). Neste estudo foi observado que α -LA inibiu a migração de células da crista neural sobre matrizes semelhantes a lâmina basal de modo dose-dependente, enquanto que em condições idênticas, α -LA não

apresentou efeito sobre a migração sobre fibronectina. E, usando proteínas controle, como uma lisozima (estruturalmente homóloga a α -LA) e BSA, verificaram que estas não afetaram a migração nestas mesmas matrizes. Com estes resultados, RUNYAN e seus colaboradores (1986) conseguiram mostrar que GalTase de superfície celular participa na migração das células da crista neural por reconhecimento e ligação aos seus substratos apropriados (laminina) na matriz delineada e que estas células empregam pelo menos dois mecanismos distintos para interação com a matriz extracelular durante a migração, um que é dependente de fibronectina e outro que usa reconhecimento GalTase de glicoconjugados de lâmina basal.

EPERLEIN e colaboradores (1998), trabalhando com embriões de anfíbios, observaram, através de imunohistoquímica, que fibronectina e tenascina estão presentes na matriz extracelular que cobre os caminhos migratórios da crista neural no momento em que as células estão migrando ativamente. Testando, *in vitro*, substratos de migração para células da crista neural de anfíbios, observaram que estas células usam fibronectina como substrato migratório e não tenascina, sugerindo que uma interação entre estes componentes da matriz extracelular é importante na regulação do subgrupo e caminhos migratórios das células da crista neural no embrião de anfíbio. MACKIE e colaboradores (1988), comparando a distribuição de fibronectina e tenascina entre embriões de *Xenopus laevis*, codorna e rato, observaram que em todas as espécies estudadas, a distribuição de tenascina esteve mais estreitamente correlacionada com os caminhos migratórios das células da crista neural que a distribuição de fibronectina, a qual é conhecida por ser importante para a migração da crista neural. Observaram que quando células da crista neural são cultivadas sobre substrato de tenascina, elas não aderem e não se espalham, ficando arredondadas, propondo que tenascina desempenha um papel importante na determinação dos caminhos migratórios das células da crista neural, talvez por alterar as interações destas células com fibronectina, ou por gerar caminhos de menos resistência em meio a matrizes de fibronectina.

KROTOSKI e colaboradores (1986) usando o anticorpo CSAT, que reconhece a subunidade $\beta 1$ de integrinas de galinha, observaram que existe uma codistribuição do antígeno CSAT e de fibronectina e laminina em embriões precoces de ave. Verificaram que os caminhos seguidos pelas células da crista neural cranial estavam cobertos com fibronectina e laminina, e que na região do tronco,

fibronectina e laminina foram observadas ao redor de uma subpopulação de células da crista neural. No entanto, nenhuma molécula exibiu o padrão de distribuição seletivo necessário para o papel de guiar a migração da crista neural no tronco, concluindo então que os níveis de CSAT, fibronectina e laminina são dinâmicos no embrião, talvez refletindo que o balanço de adesões superfície-substrato contribui para iniciação, migração e localização de algumas populações de células da crista neural. Células da crista neural migratórias aderem a fibronectina de modo integrina-dependente (KROTOSKI *et al.*, 1986) enquanto mantêm reduzidos os contatos intercelulares mediados por N-caderina (NAKAGAWA & TAKEICHI, 1995).

DELANNET e colaboradores (1994) examinaram, através de imunoprecipitação e imunohistoquímica, o possível papel da vitronectina e seu receptor integrina correspondente na adesão e migração das células da crista neural. Observaram que as células da crista neural expressam primariamente as integrinas $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ e $\alpha V\beta 5$ como possíveis receptores de vitronectina, e com estes resultados, sugerem que as células da crista neural podem aderir a e migrar sobre vitronectina *in vivo* por um mecanismo RGD-dependente envolvendo ao menos as integrinas $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ e $\alpha V\beta 5$ e que estas integrinas podem desempenhar papéis específicos no controle da adesão e migração celular.

MONIER-GAVELLE & DUBAND (1997) sugerem que, em células da crista neural migratórias, integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$ são a origem de uma cascata de eventos sinalizadores que envolvem fluxo transmembrana de Ca^{2+} , seguido pela ativação de fosfatases e quinases, e que controla a distribuição superficial e atividade de N-caderina.

O proteoglicano de condroitim sulfato e moléculas que se ligam a PNA (lectina: aglutinina do amendoim que apresenta afinidade de ligação a açúcares galactose-N-acetilgalactosamina, com especificidade para se ligar a resíduos de galactose em geral O-ligados) estão relacionados com inibição da migração das células da crista neural. OAKLEY e colaboradores (1994) mostraram que há uma redução do proteoglicano de condroitim sulfato e de moléculas ligantes a PNA no caminho dorsolateral a partir do estágio 19 do desenvolvimento. Além disso, se o dermomiótomo é removido antes da emigração de células do tubo neural, o proteoglicano de condroitim sulfato e moléculas ligantes a PNA estão ausentes e a invasão do caminho pelas células da crista neural é acelerada (ERICKSON *et al.*,

1992). NEWGREEN e colaboradores (1986) demonstraram que notocordas em cultura inibem movimentos de células da crista neural na área em que foram colocadas. PETTWAY e colaboradores (1996) sugerem que a notocorda jovem expressa condroitin sulfato (S103L), podendo assim inibir a migração nessa região em estágios precoces do desenvolvimento. KERR & NEWGREEN (1997) isolaram, caracterizaram, e compararam a estrutura e o efeito de agregam (um grande agregado de condroitim sulfato ligado a hialuronana extraído de cartilagem adulta e jovem) sobre as células da crista neural. Estes autores observaram que agregam adicionado à matriz extracelular *in vitro* causa um efeito anti-adesivo e anti-migratório sobre as células da crista neural. Estes resultados apontaram altos níveis de condroitin sulfato em áreas evitadas pelas células da crista neural e sugeriram que estas moléculas podem agir como elemento negativo de controle da migração: uma nova e distinta classe de moléculas morfogenéticas.

Os melanoblastos migram somente pelo caminho dorsolateral (ERICKSON & GOINS, 1995; REEDY *et al.*, 1998), por isso na maioria das aves, são quase que exclusivamente encontrados em tecidos periféricos como a derme e a ectoderme (HULLEY *et al.*, 1991). Em galinhas mutantes, Sedosas Japonesas hiperpigmentadas, foi observado o acúmulo de células pigmentares que conferem uma coloração negra a determinados órgãos (KUKLENSKI, 1915). Esse acúmulo de células pigmentares é progressivo conforme o estágio de desenvolvimento, estando drasticamente aumentado na fase adulta. Através da injeção do corante vital Dil na luz do tubo neural, foi observado que em embriões de galinha Leghorn a migração das células da crista neural, na região do tronco, se encerra no estágio 22, enquanto que em embriões de galinha Sedosa, no mesmo estágio de desenvolvimento, os melanoblastos continuam migrando. A migração de melanoblastos também foi observada da extremidade distal do espaço dorsolateral para dentro do mesoderma somático e para regiões mais médio-ventrais, se acumulando ao redor da aorta dorsal e ductos mesonéfricos em embriões de Sedosa. Além da intensa migração, foi observado, através da incorporação de BrdU (Bromodeoxiuridina), que estes melanoblastos continuam proliferando, podendo ser uma das causas da pigmentação interna exagerada observada em galinhas Sedosa (FARACO *et al.*, 2001).

A expressão do gene *Steel factor* coincide temporoespacialmente com a fase de expansão e subsequente diferenciação de precursores melanocíticos c-kit positivos em embriões normais, apontando um papel do sistema c-kit/Steel na sobrevivência, proliferação e diferenciação de melanócitos. Entretanto, em embriões de Sedosa Japonesa a expressão deste gene está restrita à epiderme, sugerindo que possivelmente outro fator (ou outros fatores) está envolvido no desenvolvimento de melanócitos em regiões médio-ventrais (LECOIN *et al.*, 1995).

Foi verificada outra via de sinalização que influencia a proliferação e diferenciação da linhagem melanocítica. Células da crista neural expressam receptor para endotelina 3 (EDNRB) antes e durante sua emigração do tubo neural em todos os níveis axiais em embriões de galinhas Leghorn (NATAF *et al.*, 1996). A presença de endotelina 3 (EDN3) em cultura de células da crista neural primeiro promove grande proliferação celular seguida de decréscimo na proliferação e posterior diferenciação de células melanocíticas (LAHAV *et al.*, 1996). Além disto, a inativação dos genes para endotelina 3 ou para seu receptor apresenta efeito deletério sobre o desenvolvimento de melanócitos e do sistema nervoso entérico (NATAF *et al.*, 1996).

REEDY e colaboradores (1998) sugeriram que o ambiente encontrado em embriões de galinha Sedosa possa permitir que melanoblastos migrem ventralmente, tendo acesso a regiões médio-ventrais do embrião. Dados do nosso Laboratório (DE FREITAS *et al.*, 2003) com marcação de glicoconjugados ligantes a PNA e comparando sua distribuição entre embriões das duas raças de galinhas, confirmaram o dado de OAKLEY e colaboradores (1994) de que estas moléculas estão presentes em toda via dorsolateral enquanto as células da crista neural estão migrando ventralmente e que pouco antes de iniciar a migração dorsolateral há uma redução destas moléculas nesta via. Esta redução se dá gradativamente enquanto as células da crista neural avançam por este caminho. Observaram ainda que, quando se inicia a migração pela via dorsolateral, glicoconjugados PNA-positivos aparecem na região da via ventral, sugerindo um papel inibitório destas moléculas no povoamento ventral por melanócitos em embriões de galinhas Leghorn. Já em embriões de galinhas Sedosas, as regiões ventrais, ao nível do tronco, aparecem com fraca marcação e/ou falhas na marcação, o que sugere que a ausência de glicoconjugados pode permitir que melanoblastos invadam a região ventral do

embrião. Estes glicoconjugados podem também estar envolvidos com o controle na entrada das células da crista neural no tubo digestivo. Nossos resultados demonstraram que a presença de glicoconjugados PNA-positivos no mesentério dorsal ao nível do tronco é transitória, podendo sua presença constituir barreira no momento em que as células da crista neural da linhagem neuronal alcançam o acesso ao tubo digestivo. Aos níveis vagal e sacral o mesentério dorsal se apresenta livre de ligantes a PNA no intervalo de tempo em que as células de crista neural da linhagem neuronal o alcançam (DE FREITAS *et al.*, 2003).

Então se condroitin sulfato e moléculas ligantes a PNA são inibidores de migração, estão relacionados com a demora da entrada das células da crista neural no caminho dorsolateral, permitindo que os precursores de melanócitos sejam especificados antes que iniciem a migração. As mudanças resultantes na especificação de melanoblastos podem então lhes permitir que sigam o caminho dorsolateral, seja por quimiotaxia, haptotaxia, ou simplesmente por aumento no comportamento invasivo (ERICKSON & GOINS, 1995).

1.8. RECEPTORES Eph E SEUS LIGANTES, AS EPHRINAS

Os receptores Eph e seus ligantes ephrina são proteínas de membrana que estão presentes em diversos tipos celulares embrionários e que participam de vários processos do desenvolvimento e idade adulta. Estes processos vão desde direcionamento da migração celular por estímulo ou repulsão, associação a moléculas de adesão e do citoesqueleto, angiogênese e direcionamento da formação neuronal do sistema nervoso central e periférico (KRULL *et al.*, 1997; WANG & ANDERSON, 1997; ORSULIC & KEMLER, 2000; SANTIAGO & ERICKSON, 2002).

A família Eph é a maior das famílias de receptores tirosina quinase (RTK), com 14 membros distintos. Até 1997, esta família de receptores não possuía uma nomenclatura oficial, e os mais diversos nomes foram designados a seus membros em diferentes espécies. Com o aumento dos estudos, mais membros foram sendo descobertos e sentindo a necessidade de uma nomenclatura única, formou-se um comitê de nomenclatura de Eph composto por mais de 70 pesquisadores, que estabeleceu a nomenclatura oficial para os membros da família Eph. O nome dos ligantes desta família, as ephrinas, deriva da palavra grega *ephoros* que significa supervisor ou controlador (Eph Unified Nomenclature, 1997). Da tabela 1 constam os nomes antigos e atuais para cada membro desta família e de seus ligantes.

TABELA 1- NOMENCLATURA ATUAL DA FAMÍLIA Eph E SEUS LIGANTES.

| Receptores | | Ligantes | |
|------------|--|-----------|---------------------------------------|
| Novo nome | Nomes anteriores | Novo nome | Nomes anteriores |
| EphA1 | Eph, Esk | ephrin-A1 | B61; LERK-1, EFL-1 |
| EphA2 | Eck, Myk2, Sek2 | ephrin-A2 | ELF-1; Cek7-L, LERK-6 |
| EphA3 | Cek4, Mek4, Hek, Tyro4; Hek4 | ephrin-A3 | Ehk1-L, EFL-2, LERK-3 |
| EphA4 | Sek, Sek1, Cek8, Hek8, Tyro1 | ephrin-A4 | LERK-4; EFL-4 |
| EphA5 | Ehk1, Bsk, Cek7, Hek7; Rek7 | ephrin-A5 | AL-1, RAGS; LERK-7, EFL-5 |
| EphA6 | Ehk2; Hek12 | | |
| EphA7 | Mdk1, Hek11, Ehk3, Ebk, Cek11 | | |
| EphA8 | Eek; Hek3 | | |
| EphB1 | Elk, Cek6, Net; Hek6 | ephrin-B1 | LERK-2, Elk-L, EFL-3, Cek5-L; STRA-1 |
| EphB2 | Cek5, Nuk, Erk, Qek5, Tyro5, Sek3; Hek5, Drt | ephrin-B2 | Htk-L, ELF-2; LERK-5, NLERK-1 |
| EphB3 | Cek10, Hek2, Mdk5, Tyro6, Sek4 | ephrin-B3 | NLERK-2, Elk-L3, EFL-6, ELF-3; LERK-8 |
| EphB4 | Htk, Myk1, Tyro11; Mdk2 | | |
| EphB5 | Cek9; Hek9 | | |
| EphB6 | Mep | | |

FONTE: Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the Ephrins (Cell, vol. 90, 1997).

Os receptores desta família possuem, na região extracelular, um domínio globular N-terminal, que é o principal no reconhecimento pelo ligante, seguido por uma porção rica em cisteína e duas porções fibronectina tipo III. Como receptores tirosina-quinase, os Eph possuem domínios intracelulares envolvidos na transdução de sinal. Na porção mais próxima à parte interna da membrana plasmática existem dois resíduos de tirosina que são o local de maior autofosforilação (região justamembrana e domínio quinase). Tirosina-quinases das famílias Nck, RasGap, Src e SLAP (um homólogo de Src sem um domínio catalítico) estão associadas a estes resíduos de tirosina, e o domínio tirosina-quinase parece servir de ponto de ligação para 2 subunidades de PI3 quinase: Grb e p85. Uma região conservada de 60-70 aminoácidos na parte C-terminal dos receptores Eph, que formam um domínio alfa estéril (domínio SAM), está envolvida na dimerização e oligomerização do receptor. Duas proteínas contendo SH2, Grb10 e uma fosfatase de baixo peso molecular parecem interagir com uma tirosina neste domínio. Recentemente uma porção de ligação ao domínio PDZ (“post synaptic density protein, discs large, zona occludens”) foi identificada na porção C-terminal dos receptores (NAKAMOTO, 2000; KULLANDER & KLEIN, 2002; ilustração 5).

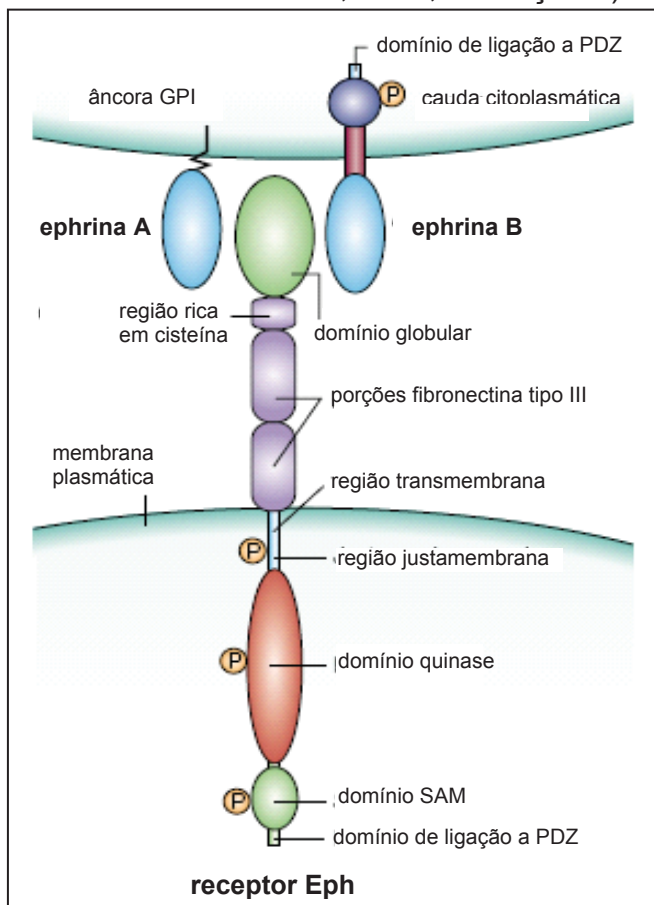


Ilustração 5

Representação esquemática da estrutura molecular dos receptores Eph e seus ligantes.

Fonte: KULLANDER & KLEIN, 2002.

Os receptores Eph são monômeros que parecem dimerizar-se em determinadas regiões da membrana plasmática para facilitar sua interação com o domínio PDZ (FRISÉN *et al.*, 1999), e o grau de multimerização pode afetar suas respostas bioquímicas e celulares. Vários desses receptores têm distribuição segmentada durante a embriogênese e a característica comum aos ligantes da família Eph, as ephrinas, é o fato de todos estarem limitados à membrana.

Conforme a homologia, preferência por ligantes e forma com que os ligantes estão dispostos na membrana, a família Eph é subdividida em 2 grupos: A e B. O grupo A possui 8 receptores (EphA 1-8) e 5 ligantes (Ephrina-A 1-5) ancorados na membrana plasmática por glicosilfosfatidilinositol (âncora GPI, Ilustração 5). O grupo B possui 6 receptores (EphB 1-6) e 3 ligantes (Ephrina-B 1-3) que são proteínas transmembrana (LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999; NAKAMOTO, 2000). Os ligantes do tipo B têm, na região citoplasmática, uma porção C-terminal altamente conservada entre os ligantes ephrina 1, 2 e 3 (Ilustração 5, cauda citoplasmática). Esta região contém 5 porções com potencial para fosforilação de tirosina e um domínio de ligação a PDZ C-terminal (Ilustração 5, domínio de ligação a PDZ), sugerindo papel na transdução de sinal. Então a interação entre célula com receptor EphB e outra célula que possui seu ligante Ephrina-B pode mediar uma sinalização bidirecional em ambas as células (NAKAMOTO, 2000). Com exceção do receptor EphA4, a ligação cruzada entre membros dos grupos A e B parece bem limitada. Apesar de haver um alto grau de interligações entre receptores e ligantes da mesma classe, há diferentes afinidades entre estas ligações, o que faz com que um determinado receptor tenha preferência por um determinado ligante (FRISÉN *et al.*, 1999). Na ilustração 6 pode-se verificar as possíveis interações entre receptores e ligantes da família Eph.

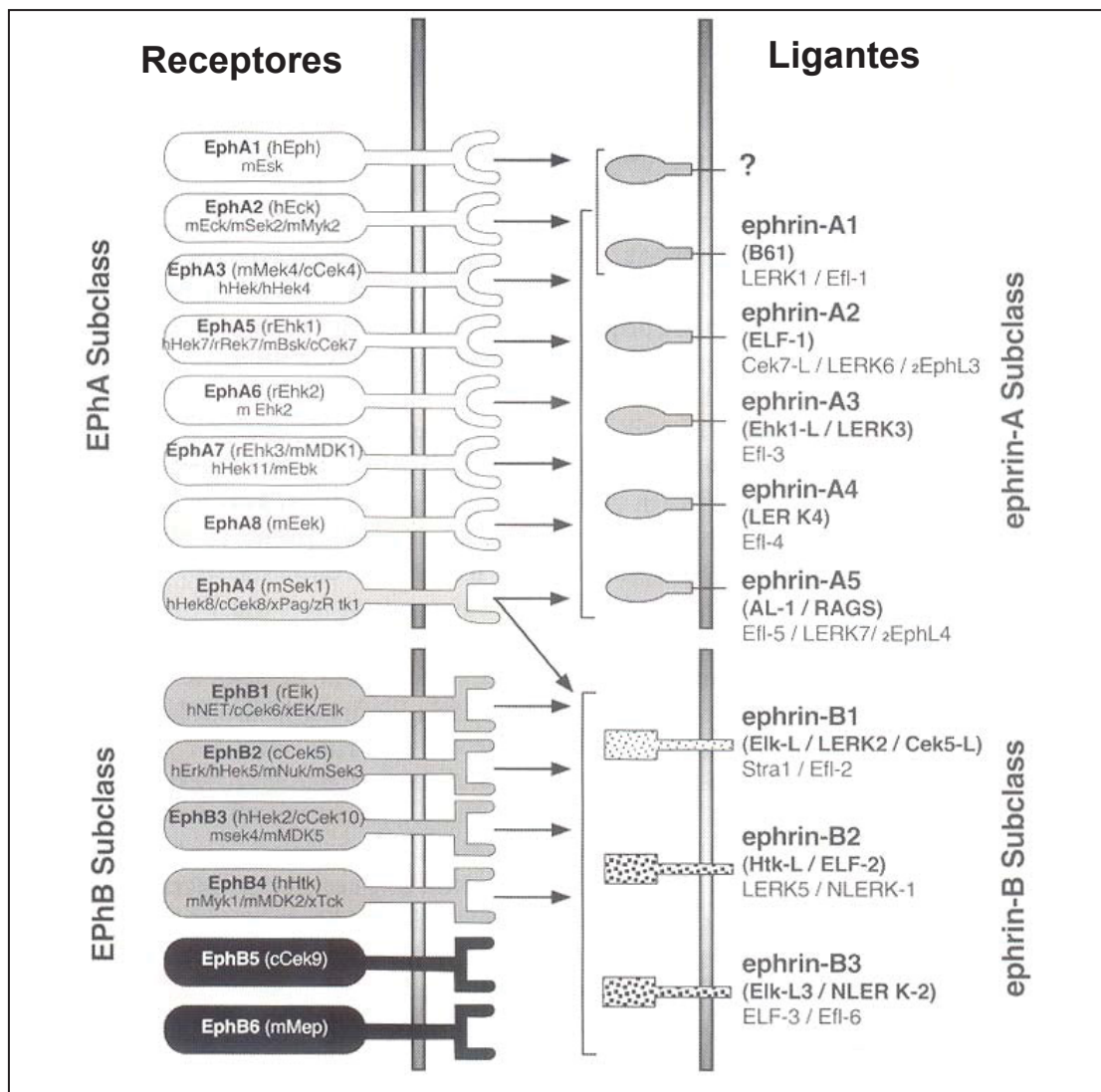


Ilustração 6

Interação entre os membros das subclasses A e B de receptores Eph e ligantes ephrina.

Fonte: LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999.

Células endoteliais e células da crista neural podem expressar ephrinas ou seus receptores. HOLMBERG e colaboradores (2000), trabalhando com camundongos, verificaram que durante a neurulação a ephrina-A5 é co-expressada com o receptor EphA7 em células que formam as pregas neurais. A ligação da ephrina-A5 com o receptor EphA7 promove a adesão celular e o fechamento do tubo neural. Em camundongos que não expressam este receptor, as células sofrem repulsão e não há o fechamento do tubo neural, causando anencefalia. Eles concluíram que dependendo do receptor para ephrina que está sendo exposto

pode haver a repulsão ou a adesão entre as células durante o desenvolvimento embrionário.

Ephrinas-B1 e B2 que se distribuem no esclerótomo posterior de galinha e rato, parecem contribuir para o padrão segmental de formação do sistema nervoso periférico, restringindo a formação dos gânglios e crescimento dos axônios ao somito anterior. As células de crista neural que expressam receptores EphB2 que reconhecem estes ligantes limitam sua migração à região do somito anterior, que está livre de ephrinas (WANG & ANDERSON, 1997). Em aves, foi observado que as ephrinas funcionam como inibidoras da migração para as células da crista neural de linhagem neuronal, mas funcionam como promotoras da migração para os melanoblastos (SANTIAGO & ERICKSON, 2002). Desse modo, a proteína ephrina-B participa da orientação dos melanoblastos ao longo do caminho dorsolateral e previne que células da crista neural que migram precocemente invadam este caminho. Durante a migração pela via ventral, na região do tronco, o caminho dorsolateral está repleto de ephrinas, assim como a metade posterior do esclerótomo, evitando que as células da linhagem neuronal sigam por estas áreas. Estudos feitos com explantes de tronco e células cultivadas confirmaram o papel inibitório das ephrinas. Os explantes mostraram que, ao se adicionar ao meio a proteína ephrina-B1 solúvel, as células de linhagem neuronal invadiram o caminho dorsolateral. Essa mesma proteína causou o colapso e a retração dos processos celulares nas células em cultivo (KRULL *et al.*, 1997). Outros trabalhos foram feitos com explantes de tronco por SANTIAGO & ERICKSON (2002). Estas pesquisadoras utilizaram ephrinas fusionadas com a porção Fc de anticorpos humanos e confirmaram os resultados obtidos por KRULL e colaboradores (1997). Além disso, descobriram que as ephrinas-B continuam a ser expressas ao longo do caminho dorsolateral durante a migração dos melanoblastos. Com análises de RT-PCR, hibridização *in situ* e marcação de superfície celular de células da crista neural em cultivo, demonstraram que os melanoblastos expressam vários receptores para ephrinas. Análises de adesão mostraram que a ligação da ephrina com seu receptor aumenta a adesão do melanoblasto com a fibronectina, assim estimulando a migração destas células.

1.9. MIGRAÇÃO X CRESCIMENTO DIFERENCIAL

O termo migração em livros-texto de embriologia e biologia do desenvolvimento (CARLSON, 1996; WOLPERT *et al.*, 2000; MOORE & PERSAUD, 2004) tem sido referido como a movimentação de uma estrutura de um local para outro dentro do corpo do embrião. Entretanto, grandes mudanças no tamanho e forma do embrião estão ocorrendo durante o desenvolvimento, levantando algumas questões a este respeito. Será que ao invés de uma estrutura migrar de um local para outro, ela não estaria simplesmente mudando sua posição devido ao crescimento diferencial (mudanças no tamanho e forma do embrião e suas partes) deste embrião? Por isto, alguns eventos durante a embriogênese de mamíferos que são considerados tradicionalmente como migratórios têm sido reexaminados (GASSER, 2006). Em seu estudo foram utilizadas reconstruções tridimensionais de imagens de cortes seriados de embriões humanos e de ratos, tomando sempre um ponto de referência no centro de cada reconstrução. Como exemplo relevante para o presente trabalho, se faz necessário citar o reexame da formação do gânglio espinhal a partir da crista neural tomando-se por ponto central de referência a notocorda. Sempre foi descrito que as células da crista neural que originam os gânglios espinhais migram ventralmente da sua origem, a porção dorsal do tubo neural. O resultado da análise de reconstruções tridimensionais de imagens deste evento no desenvolvimento, indica que se as células da crista neural precursoras do gânglio espinhal migrassem ventralmente da sua origem na porção dorsal do tubo neural, elas se localizariam num plano horizontal ao nível da notocorda. Então com o crescimento e a expansão do tubo neural, as células da crista neural não precisam migrar para formar o gânglio espinhal, apenas esse movimento resultante do crescimento diferencial é suficiente para colocá-las na localização correta (GASSER, 2006).

No entanto, esta teoria não seria suficiente para explicar todos os eventos que são, até o momento, considerados migratórios. Por isso ainda se fazem necessários muitos estudos acerca dos processos morfológicos e moleculares envolvidos no desenvolvimento embrionário normal. O que torna a biologia do desenvolvimento uma das áreas de pesquisa mais intrigantes e envolventes em toda a biologia.

O presente trabalho foi dividido em 4 capítulos, dos quais esta revisão de literatura representa o primeiro. No segundo capítulo se encontram os resultados referentes à investigação da expressão de ephrinas e a distribuição de glicoconjugados PNA-positivos em embriões de galinha Sedosa Japonesa, com o objetivo de analisar a influência destas moléculas no padrão alterado de migração anteriormente descrito para células de linhagem melanocítica nesta raça. Os resultados compõem o artigo já submetido à publicação no periódico *Developmental Dynamics*, intitulado: "THE DISTRIBUTION OF EPHRINS AND PNA-POSITIVE GLYCOCONJUGATES IS CORRELATED WITH ATYPICAL MELANOBLAST MIGRATION IN SILKY CHICKEN EMBRYOS". O terceiro capítulo refere-se ao mapeamento dos trajetos migratórios das células da crista neural ao nível axial vagal (somente entre somitos 2 a 5), com uso de injeção de corante lipofílico Dil e imunomarcacão, paralelamente à identificação de componentes de matriz extracelular, ephrinas e ligantes a PNA. Estes resultados foram enviados para Dr^a Carol A. Erickson, Universidade da Califórnia – EUA, com quem temos colaboração. Eles estão sendo reunidos a outros dados obtidos no Laboratório da Dr^a Carol, com uso de proteína fluorescente (GFP), bem como de vídeo-microscopia conjugada a marcações com Dil e HNK-1, para a confecção de um manuscrito que será submetido à publicação. Do quarto e último capítulo constam as conclusões finais e perspectivas para continuação deste trabalho.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos anteriores do nosso Laboratório demonstraram que o fenótipo observado na ave Sedosa Japonesa é resultado da migração atípica de melanoblastos para regiões médio-ventrais do embrião (REEDY *et al.*, 1998; FARACO *et al.*, 2001). Como a migração de melanoblastos é positivamente regulada por ligantes ephrina (SANTIAGO & ERICKSON, 2002) e negativamente relacionada com a presença de glicoconjugados PNA-positivos (OAKLEY *et al.*, 1994) em embriões de Leghorn, surgiu a questão: seria o fenótipo observado em aves Sedosa Japonesa também devido à distribuição diferenciada de ligantes ephrina-B e/ou de glicoconjugados PNA-positivos?

Além disto, como se pode observar, existem muitos estudos temporais e espaciais sobre migração e distribuição final das células da crista neural em quase todos os níveis axiais, seja por experimentos indiretos com transplantes, remoção de partes do tubo neural, cultura de explantes e marcação por imunohistoquímica, ou por experimentos diretos nos quais usam-se corantes vitais. Entretanto, na região vagal os estudos realizados até o momento mostram alguns dos destinos finais das células da crista neural, principalmente dos precursores entéricos que povoam o tubo digestivo, mas não descrevem a trajetória das células, nem as influências ambientais que as levam a escolher as rotas seguidas. A relação entre o exato nível axial de origem das células e as diferentes vias migratórias não foi ainda analisada na região vagal. Também ainda não está feita a distinção entre as trajetórias seguidas pelas células da crista neural vagal que compõem cada uma das três ondas migratórias observadas. Por esse motivo no presente trabalho a proposta foi utilizar a injeção pontual do corante vital Dil, em diferentes períodos do desenvolvimento e em diferentes pontos do tubo neural correspondentes ao nível vagal, para determinar os caminhos precisos percorridos pelas células da crista neural, ao longo das três ondas migratórias, primeira onda dorsolateral, onda ventral e segunda onda dorsolateral. Adicionalmente, foram realizadas imunomarcações com o anticorpo HNK-1 (que reconhece células da crista neural) em cortes histológicos ao nível vagal de embriões em diferentes estágios do desenvolvimento. Optou-se pela análise do nível correspondente aos somitos de 2 a 5, pois essa área

abrange a crista neural cardíaca e também a subpopulação que está relacionada com a inervação entérica. Além disto, para verificar se a transição no padrão de migração vagal-tronco realmente ocorre entre o somito 3 e 4, como anteriormente descrito (FERGUSON & GRAHAM, 2004).

Com os resultados obtidos das imunomarcações para detectar ligantes ephrina-B e glicoconjugados PNA-positivos realizadas na região do tronco (segundo capítulo desta tese), surgiram novas questões: Como estas moléculas estariam distribuídas na região vagal? Teriam alguma relação com a distribuição dos derivados da crista neural neste nível axial? Por isso, além do mapeamento das células ao nível vagal, foram realizadas imunomarcações específicas para detectar os ligantes ephrina-B e reações histoquímicas para detectar glicoconjugados PNA-positivos.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral relacionar a distribuição de ephrinas-B e glicoconjugados PNA-positivos com a migração de melanoblastos em embriões de galinhas Sedosa Japonesa e Leghorn ao nível do tronco, e o estudo temporal e espacial da migração e distribuição das células da crista neural vagal e sua relação com estas moléculas em embriões de galinhas Leghorn; e como objetivos específicos:

- comparar a distribuição de melanoblastos entre somito anterior e posterior ao nível do tronco em embriões de galinhas Sedosa Japonesa e Leghorn;
- detectar, através de histoquímica, o padrão de distribuição de ligantes ephrina-B e glicoconjugados PNA-positivos durante a migração de melanoblastos ao nível do tronco em embriões de galinhas Sedosa Japonesa e Leghorn;
- relacionar a presença de ligantes ephrina-B com a distribuição de fibronectina ao nível do tronco em embriões de galinhas Sedosa Japonesa e Leghorn;
- analisar a distribuição de melanoblastos após a perturbação da interação receptor EphB/ephrina-B ao nível do tronco em embriões de galinhas Sedosa Japonesa e Leghorn;
- analisar a distribuição de melanoblastos após o bloqueio de glicoconjugados PNA-positivos ao nível do tronco em embriões de galinhas Sedosa Japonesa e Leghorn;
- mapear os caminhos exatos percorridos pelas células da crista neural vagal nas regiões correspondentes a cada um dos somitos, durante as três ondas migratórias que ocorrem neste nível axial;
- identificar os tempos precisos de cada uma das três ondas migratórias em cada somito;
- detectar, através de métodos de imunohistoquímica, se há presença de ligantes ephrina-B em determinadas regiões do embrião por onde ocorre migração das células da crista neural neste nível axial;

- detectar, através de métodos de histoquímica e imunohistoquímica, a distribuição de glicoconjugados da matriz extracelular PNA-positivos e de células da crista neural, respectivamente, neste nível axial.

CAPÍTULO 2

**THE DISTRIBUTION OF EPHRINS AND PNA-POSITIVE GLYCOCONJUGATES
ARE CORRELATED WITH ATYPICAL MELANOBLAST MIGRATION IN SILKY
CHICKEN EMBRYOS**

THE DISTRIBUTION OF EPHRINS AND PNA-POSITIVE GLYCOCONJUGATES IS CORRELATED WITH ATYPICAL MELANOBLAST MIGRATION IN SILKY CHICKEN EMBRYOS

Patrícia Franchi de Freitas¹, Marisa Essenfelder Borges¹, Fabiana de Fátima Ferreira¹, Ana Carolina Portugal Portella¹, Carol Ann Erickson² and Cloris Ditzel Faraco¹

¹Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 81531-990, Paraná, Brazil

²Section of Molecular and Cellular Biology, University of California at Davis, Davis, California 95616, USA

Correspondence to: C.D. Faraco

Phone: 55 (41) 3361-1750

Fax: 55 (41) 3256-7575

e-mail: cdfaraco@ufpr.br

Running title: Ephrin-B distribution in the Silky fowl embryo

Key words: neural crest, Silky fowl, melanoblasts, ephrin-B, EphB receptors, morphogenesis, PNA

Grant Sponsor: NIH; Grant number: GM 53258

Grant Sponsor: American Heart Association; Grant Number: 0455041Y

ABSTRACT

A number of molecules have been described that positively or negatively regulate neural crest cell migration. Melanoblasts are positively stimulated to migrate in the dorsolateral pathway by ephrins (Santiago and Erickson, 2002), but inhibited from leaving the dorsolateral pathway by PNA-binding glycoconjugates. Chicken strains with naturally-occurring modifications in pigment patterns offer us a convenient and useful model to assess the molecular controls of pigment cell migration. We analyzed the role of ephrin-Bs and PNA-positive glycoconjugates in the Japanese Silky (SK) fowl, which displays intense internal pigmentation and an altered pattern of pigment cell migration (Faraco et al., 2001). The distribution of ephrin ligands was analyzed using Eph receptor-human Fc fusion proteins. We also injected ephrin-B1-Fc fusion proteins *in ovo* to interfere with Eph receptor signaling. Glycoconjugates were labeled by PNA-FITC, and their function was assessed by blocking with PNA injected *in ovo*. In Silky embryos ventral areas expressed ephrins in a pattern that correlates with the atypical migratory pathways taken by SK melanoblasts. Fibronectin is also present in the paths followed by SK melanoblasts. White Leghorn embryos displayed no ephrin-Bs or fibronectin in the ventral paths that are followed by SK melanoblasts. Conversely the PNA barrier tissues in WL embryos that have been proposed previously to prevent melanoblasts from migrating ventrally are missing or have significant gaps in the SK embryos. Thus studies of a naturally occurring pigmentation mutant confirm that a combination of cues, both positive and negative, regulates melanoblast migration in the chick embryo.

INTRODUCTION

Neural crest cells are highly migratory and take defined routes through the embryo to their final destination (Le Douarin and Kalcheim, 1999). At the thoracic and sacral levels in the chicken embryo, neural crest cells follow two pathways: a ventral route between the somite and the neural tube and then through the anterior somite, which is taken by neuronal and glial precursors (Le Douarin and Teillet, 1974; Bronner-Fraser, 1986; Serbedzija et al., 1989) and a dorsolateral route between the somite and epidermal ectoderm, along which melanoblasts (pigment cell precursors) migrate (Hulley et al., 1991; Kitamura et al., 1992; Reedy et al., 1998a). In most species of birds there are very few pigment cells that are found in the ventral pathways. However in the Japanese Silky (SK) fowl there is extensive pigmentation in the internal organs (Kuklenski, 1915; Makita and Moshizuki, 1984), which results from an atypical dispersal of melanoblasts ventrally (Reedy et al., 1998b; Faraco et al., 2001), in addition to their usual pattern of migration into the dorsolateral space. The SK fowl has therefore emerged as a useful model system with which to investigate the molecular control of pigment patterning.

The migration of melanoblasts into the ventral region of the SK embryo correlates with the absence of inhibitory molecules, especially PNA-positive glycoconjugates, along the ventral route (Faraco et al., 2001). PNA binding occurs in those regions that neural crest cells and neuronal axons fail to invade and therefore is considered a marker for barriers to cell migration (Oakley and Tosney, 1991). Such PNA-positive regions include the posterior half of the somite (Oakley et al., 1994), the dorsal mesentery at the thoracic level (de Freitas et al., 2003), and the dorsolateral pathway from which PNA binding disappears as melanoblasts invade (Oakley et al., 1994). When embryos are treated with PNA to obscure the PNA binding sites, these regions are now invaded by the neural crest (Krull et al., 1995), supporting the idea that PNA-binding glycoconjugates are barriers to migration. Previous work from our labs shows that in the normal chick embryo there are regions of PNA-positive labeling that develop at the time of melanoblast migration, and which keep these cells from migrating between the neural tube and somite or prevent cells in the dorsolateral space from migrating through or around the myotome in order to

disperse ventrally. The SK embryo does not develop these barrier tissues (de Freitas et al., 2003).

Neural crest migration is regulated by overlapping and redundant cues. One migratory cue is signaled by the Eph receptors and their ligands, the ephrins. The Eph receptors are tyrosine kinases and their ligands are cell-surface associated. In general when the receptor and ligands interact there is a collapse response that inhibits migration into the ephrin-rich environment (Nakamoto, 2000; Klein, 2001; Krull, 2001). Eph receptors are expressed by neural crest cells, and their ligands are found in pathways that are avoided by the neural crest (Krull et al., 1997; Wang and Anderson, 1997; Santiago and Erickson, 2002). When neural crest cells are cultured on ephrin-B1, they undergo a collapse response. Furthermore, when the ephrin-B/EphB receptor interaction is perturbed in vivo, neural crest cells invade the posterior somite (Krull et al., 1997). Ephrin-Bs expressed in the dorsolateral space also repel neuronal and glial precursors and so direct them ventrally (Santiago and Erickson, 2002). Conversely, melanoblasts are not inhibited by EphB/ephrin-B signaling, but rather are stimulated to migrate and to increase their adhesion to fibronectin. Consequently melanoblasts can invade the ephrin-B-rich dorsolateral space (Santiago and Erickson, 2002).

In this paper, we report that the SK phenotype is correlated with the altered expression of ephrin-Bs in conjunction with the previously reported irregular distribution of PNA-positive glycoconjugates. Melanoblasts follow ephrin-B-positive spaces in the ventral regions of the SK embryo, including through the posterior half of the somite, and they gain access to these ephrin-B pathways owing to a lack of PNA-positive barriers that develop in the normal chicken embryo. When EphB/ephrin-B interactions are perturbed using ephrin-B1-Fc fusion proteins, melanoblasts do not migrate ventrally or dorsolaterally in the SK embryo. Thus a combination of cues, both positive and negative, regulates melanoblast migration in the chick embryo.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Embryos

Fertile SK chicken eggs were obtained from the Avian Facilities at Universidade Federal do Paraná and WL chicken eggs were provided by Da Granja Agroindustrial Ltda. The eggs were incubated at 38°C in a forced draft incubator and embryos were staged (stages 18 to 28) according to Hamburger and Hamilton (1951).

Mapping of Melanoblasts

Forty to 50 serial sections were collected from the wing-bud level of each embryo and immunolabeled with Smyth-line (SL) serum. For each section, the position of every SL-positive cell in that section was mapped onto a schematic of an embryo cross-section. The maps in Figure 1 represent the dorsoventral and mediolateral position of every SL-positive cell in an individual section from a representative embryo. Six to eight embryos were mapped for each stage, and no significant variability in the patterns of SL immunoreactivity across embryos was observed (Reedy et al., 1998b).

Detection of Ephrin-B Ligands

Trunk and sacral regions of SK and WL embryos were embedded in Tissue-tek (Fisher), frozen at -20°C and sectioned in an IEC cryostat. Sections were collected on gelatinized slides and fixed in 4% paraformaldehyde, blocked in PBS/1% BSA (Sigma), and incubated with EphB2-Fc (rmEphB2 chimera; R&D Systems) to identify the presence of ephrin-B ligands. After several washes and inactivation of endogenous alkaline phosphatase by incubation at 70°C for 1 hour, sections were incubated in AP-conjugated goat anti-human IgG (Promega), and developed with NBT (0.34mg/ml; Sigma) and BCIP (0.18mg/ml; Sigma) in pH 9.5 0,1M Tris buffered saline (0,05M MgCl₂; 0,1M NaCl). The sections were deparaffinized and dehydrated, coverslipped with Permount, and analyzed with a Leitz Dialux microscope.

Detection of Extracellular Matrix Glycoconjugates

Embryo segments from the trunk at wing-bud level were fixed in Bouin's fixative for 1 hour at room temperature and embedded in Paraplast. Six-micrometer sections were deparaffinized, hydrated and blocked with 2% goat serum, 0.5% BSA (Sigma), in PBS for 15 min. Slides were then incubated in FITC-peanut agglutinin (PNA; Vector Labs), diluted 1:200 in blocking buffer. After several washes, slides were coverslipped with Gelmount (Biomed) and analyzed by epifluorescence. Control sections were incubated in 0.2M galactose prior to PNA labeling.

Immunocytochemistry

Melanoblasts were identified by using SL serum (a gift from Dr. Raymond Boissy; Reedy et al., 1998a). After fixation in 4% paraformaldehyde, embryos were soaked in 5% and 15% sucrose, infiltrated in 7.5% gelatin/15% sucrose and snap-frozen in liquid nitrogen. Ten-micrometer sections were incubated with SL serum diluted 1:400 in PBS/1% BSA (Sigma), overnight at 4°C. The secondary antibody was FITC-goat anti-chicken (Chemicon) diluted 1:200. Fibronectin (FN) distribution was determined using anti-fibronectin B3/D6 (Iowa Hybridoma Bank; 1:200) followed by a TRITC-goat anti-mouse IgG antibody (Sigma; 1:200).

Perturbation of EphB Receptor Signaling and PNA-binding Glycoconjugates

Incubated eggs were windowed to permit access to the embryo, and either 200 µl of ephrin-B1-Fc (10 µg /ml) in PBS, or 100 µl of FITC-PNA (100 µg/ml) in PBS was injected into the amniotic cavity. Eggs were sealed and returned to the incubator for further development. After 24-36 hours, embryos were fixed in 4% paraformaldehyde, prepared for cryosectioning, and labeled with SL serum as described above. Control embryos were injected with PBS.

RESULTS

Distribution of Melanoblasts in WL and SK Embryos

We have previously reported that in the Japanese Silky mutant embryo, melanoblasts migrate between the somite and the neural tube in the ventral pathway, in addition to their usual invasion of the dorsolateral path (Reedy et al., 1998b; Faraco et al., 2001). The distribution of melanoblasts was summarized in composite maps resulting from the analysis of 400- μ m tissue segments (40 sections total) at the wing bud level. Melanoblasts were identified with Smyth-line (SL) serum (Reedy et al., 1998a) and every SL-positive cell in each section was depicted as a dot on the maps.

To summarize our previous data, melanoblasts in the SK embryo initiate their dorsolateral migration slightly later than the WL embryo (stage 20 in SK embryos vs. stage 19 in WL). However, SK melanoblasts increase in number rapidly to occupy the dorsolateral pathway. At stage 20 in the SK embryo, melanoblasts also take the ventral path, at first in small numbers. By stage 28 the entire ventral area around the dorsal aorta, the mesonephric kidney and the dorsal mesentery is filled with melanoblasts in SK embryos, whereas few-to-no SL-positive cells are seen in this region in WL or quail embryos.

The previously published maps represented the compression of 40 sections without regard to the anterior/posterior compartments of the somite. However we know that neural crest cells avoid the posterior somite owing to the presence of inhibitory molecules (Oakley et al., 1994; Krull et al., 1995) and invade the anterior somite (Erickson and Perris, 1993). To assess whether the same pattern is maintained in Silky embryos, we reanalyzed each individual schematic made from our previous studies as well as generating additional new sections of the trunk at the wing bud level of stage 20-28 embryos, and we could find no differences between the distribution of melanoblasts in the anterior and posterior somites in SK embryos (Fig. 1). SL-labeled cells following the ventral route in the anterior (A) and posterior (B) somite are shown in Figure 2. The labeled cells are not scattered throughout the sclerotome, but rather follow distinct paths. In the anterior somite, the SL-positive cells go around the dorsal root ganglion, in close proximity to the myotome. In the posterior somite, where there is no ganglion, immunolabeled cells are apposed to the

basal surface of the myotome, and they are also spread on the surface of the neural tube and around the notochord.

The Migration of Melanoblasts Through the Dorsolateral Pathway Correlates with the Distribution of Ephrin-Bs

Ephrin-Bs have a dual role in neural crest cell migration: they inhibit the motility of neuronal and glial precursors and stimulate melanoblast motility (Santiago and Erickson, 2002). We therefore analyzed the expression pattern of ephrin-Bs in SK and WL chicken embryos at stages 20-28 using the EphB2-Fc fusion protein in which the EphB2 ectodomain is fused to the Fc portion of human IgG. We observed that in the anterior as well as in the posterior somite, at stages when melanoblast migration into the dorsolateral path is beginning (stage 20), only the more medial portion of the dorsolateral path expresses ephrin-Bs (Fig. 3 A, C, E, G), whereas at later stages when dorsolateral migration is well underway, ephrin-Bs are expressed along the entire length of the dorsolateral path (as defined by the length of the dermamyotome). There are some minor differences in the distribution of ephrin-Bs between the SK and WL embryos: in SK embryos at stage 24, ephrin-Bs are expressed along the entire dorsolateral path (Fig. 3 B, F), whereas in the WL embryos at the same stage, the zone of expression is more restricted, extending only half way along the dorsolateral path (Fig. 3D, H). The regions of intense expression correspond precisely to the distribution of SL-positive cells in the pathway; by stage 24, melanoblasts in the SK embryo have spread farther than in the WL (Fig. 1 and see published maps in Reedy et al., 1998b; Faraco et al., 2001). By stages 26-28, ephrin-B expression extends the length of the dorsolateral path in both strains (Fig. 4). There is a medial to lateral loss of glycoconjugates from this path as melanoblasts advance, as has been previously reported (Oakley et al., 1994; de Freitas et al., 2003). Therefore the progressive expansion of ephrin-B expression (a positive migratory cue) with the concomitant loss of PNA-positive glycoconjugates (an inhibitory cue) together may permit migration in the dorsolateral space.

A Regular Distribution of Proposed Inhibitory and Stimulatory Molecules is Gradually Established as Melanoblasts Migrate Ventrally

The ventral pathway is not taken by melanoblasts in WL embryos but is invaded extensively by melanoblasts in the SK embryo. Some melanoblasts enter this pathway after stage 20 by migrating between the somites and neural tube. However most melanoblasts come to occupy the ventral region of the embryo by first migrating along the dorsolateral route, exiting at the ventral (distal) end of the dorsolateral pathway, and then migrating medially through the sclerotome (Fig. 1). We wanted to determine if ephrin-B expression in the SK embryo correlated with the ventral pattern of dispersion.

Ephrin-B and PNA expression in the anterior somite. In the anterior somite, ephrin-B expression is weak at stages 20-22 in both SK and WL embryos (Fig. 3 A, C). At these stages, there is strong PNA labeling in the perinotochordal mesenchyme in the anterior somite (Faraco et al., 2001; de Freitas et al., 2003). From stage 24 on, obvious differences between SK and WL embryos develop. In SK embryos the sclerotome has increasing ephrin-B expression that is particularly strong in the region that extends from the dorsal neural tube to the level of the notochord (Fig. 3B). Even the perinotochordal mesenchyme now expresses ephrins. At later stages (26-28), ephrin-B expression in the anterior ventral pathway is fairly uniform throughout the sclerotome and the intermediate mesoderm (kidney). This expression is even evident in the most lateral mesoderm, which connects the exit point from the dorsolateral path with the sclerotome and is the region through which melanoblasts migrate (Fig. 4A). This latter region is also free of PNA-positive molecules (compare Fig. 4A and B). Thus, the path taken by melanoblasts in SK embryos is filled with ephrin-Bs and is free of PNA-binding glycoconjugates.

Stage-24 WL embryos at the anterior somite level show some ephrin-B expression in the sclerotome but only dorsal to the notochord. The perinotochordal mesenchyme is conspicuously free of ephrins (Fig. 3D). The regions without ephrin-B expression in the ventral pathway, notably the perinotochordal sclerotome, are occupied by PNA-positive glycoproteins (de Freitas et al., 2003). At later stages (26-28), WL embryos show a complex pattern of ephrin-B distribution (Fig. 4C). Of particular note is the absence of ephrin-Bs leading from the exit of the dorsolateral pathway and their absence in the ventral pathway along the myotome. Both of these

regions are traversed by melanoblasts in the SK embryo. Additionally there is intense PNA labeling at stage 26 in the WL embryo (Fig. 4D), which correlates with those regions not crossed by melanoblasts. Therefore those regions that are invaded by melanoblasts in the SK embryo are those spaces in the WL that do not contain ephrin-Bs and are bordered by PNA-binding glycoconjugates.

Ephrin-B and PNA distribution in the posterior somite. The strong expression of ephrin-Bs observed in the posterior somite at stages when the neural crest are migrating through the anterior somite (stage 14-17 in the thoracic region) is still present in both SK and WL embryos at the time melanoblasts initiate dorsolateral migration (stage 20). Labeling is evident throughout the entire posterior somite, and seems especially strong in WL (Fig. 3E, G). The same region is also heavily labeled by the PNA lectin (Oakley and Tosney, 1991; de Freitas et al., 2003). By stage 24, SK embryos show a uniform expression of ephrin-Bs throughout the sclerotome but in the WL embryos, there is a virtual absence of ephrin-Bs in the ventral sclerotome in the region where melanoblasts are exiting the dorsolateral pathway and moving medially in SK embryos (Fig. 3H). There is a fairly uniform distribution of ephrin-Bs in the posterior somite of stage-28 SK embryos, with concentrated areas over and around the neural tube, beneath the myotome, and ventrally around the notochord, the dorsal aorta and at the mesonephric kidney. Those regions of expression are continuous with the dorsolateral pathway, which also contains ephrin-Bs (Fig. 4E). SL-positive cells are observed in the areas of the posterior somite where ephrin-Bs are detected (see Fig. 2B and 4E). At stage 28, there is no ephrin-B expression in the ventral pathway of WL embryos (Fig. 4G) where melanoblasts are migrating in SK. Additionally much of the posterior sclerotome is filled with PNA-positive molecules (Fig. 4H). In summary, there is a complementary distribution of SL-positive cells and PNA labeling in the WL and SK; specifically, melanoblasts are found in ephrin-B-positive spaces that are free of PNA. The spaces through which SK melanoblasts migrate are filled with PNA in the WL embryo.

Ephrins Show a Codistribution with Fibronectin

Ephrin-Bs enhance adhesion of melanoblasts to fibronectin, and thus facilitate their migration (Santiago and Erickson, 2002). We analyzed the distribution of fibronectin in stage 22-28 WL and SK embryos and observed that all the paths

occupied by migrating melanoblasts were positive for fibronectin as well as ephrin-Bs. Specifically in SK embryos fibronectin is present in the ventral and dorsolateral pathways (Fig. 5A), and in WL embryos the dorsolateral path is strongly positive (Fig. 5B), whereas there is much less immunolabeling in the ventral path compared to the SK embryos.

Ephrins in the Developing Mesentery Control the Access of Neural Crest Cells to the Gut

SK embryos are also distinguished from WL by the numerous pigment cells in the dorsal mesentery and connective tissue of the gut. In SK and WL embryos the early migrating neuronal and glial precursors do not enter the mesentery dorsal to the gut at the thoracic levels, although early migrating crest enter the gut at the sacral level. At the thoracic level a barrier of PNA-positive glycoconjugates (de Freitas et al., 2003) and Slit2 (De Bellard et al., 2003) is correlated with the inhibition of access of neuronal and glial precursors to the gut. We observe that by stage 20 in both SK and WL embryos the dorsal mesentery is positive for ephrin-Bs at the thoracic but not at the sacral level (Fig. 6A, B). At this stage neuronal and glial precursors are en route to the gut at the sacral level and so the absence of ephrins is correlated with a positive migratory signal. Cells invading the gut at the sacral level are delayed in their invasion of the gut wall, and spend some time in the dorsal mesentery where they give rise to the Remak ganglion (Le Douarin and Teillet, 1973; Burns and Le Douarin, 2001). Interestingly, we observed ephrin-B expression in the gut wall at stage 20 at the sacral level, which is downregulated between stages 22 and 24 (Fig. 6D). Ephrin-Bs in the gut wall may be exerting an inhibitory role and regulating the time when neural cells populate the posterior enteric gut. The thoracic dorsal mesentery displays EphB2-Fc and PNA binding and is correlated with the failure of neural crest cells to invade this region, suggesting that these molecules, among others, have a combinatorial role in the guidance of neural crest cells. In SK embryos by stage 28, when only melanoblasts are migrating ventrally, access to the gut wall is correlated with the presence of ephrin-Bs (which is a positive cue for melanoblasts) and the lack of PNA-binding glycoconjugates (an inhibitory cue) in the dorsal mesentery (see Fig. 4).

Perturbation of the Migration Pattern by Blocking EphB Receptors and PNA-Positive Glycoconjugates.

We injected ephrin-B1-Fc and PNA lectin into the amniotic sac of stage-18 embryos in an attempt to disrupt EphB-receptor signaling and PNA influence on migration, especially melanoblasts in SK embryos. Similar techniques have been used to analyze this influence at earlier stages in WL embryos (Krull et al., 1997; Santiago and Erickson, 2002). Because EphB receptors positively regulate melanoblast migration, we predicted that when ephrinB1-Fc binds EphB receptors on neural crest cells so that they cannot bind ephrins in their environment, melanoblasts will not migrate. SK and WL embryos treated with ephrin-B1-Fc fusion proteins at stage 18 and fixed 24-36 hours later both have disrupted melanoblast migration. SL-positive cells accumulate in the migration staging area, dorsal and lateral to the neural tube (Fig. 7A, D). Some melanoblasts are seen along the dorsolateral path, but in small numbers when compared with control embryos injected with PBS (Fig. 7C, F; see also Fig. 1). There appears to be a larger number of melanoblasts in SK than in WL embryos, although we did not quantify this observation. In control SK embryos there are always a few cells in the ventral path (Fig. 7 C, I), but labeled cells are rare in ephrin-B1-Fc-treated embryos.

PNA treatment had no apparent effect on the migration of melanoblasts at these later stages. SL-positive cells were distributed in the same pattern as in control embryos (Fig. 7C, F, I). The injected FITC-PNA clearly labeled the areas where glycoconjugates have been described previously, confirming that it had access to the tissue through the amniotic fluid (Fig. 8). In SK embryos, ventral regions that bound PNA were still avoided by melanoblasts (Fig. 8), indicating that this treatment failed to abrogate the presumed barrier function of PNA-binding glycoconjugates.

DISCUSSION

Previous studies from our labs have shown that the SK phenotype results from an atypical migration of melanoblasts into the ventral regions of the embryo (Reedy et al., 1998b; Faraco et al., 2001). Because melanoblast migration is positively regulated by ephrins in WL (Santiago and Erickson, 2002), we asked whether the SK phenotype could be due, in part, to abnormal ephrin distribution. We discovered that: 1) the unusual pathways followed by melanoblasts in the SK embryo are filled with ephrin-Bs and that there is a much broader ventral distribution of ephrins in SK than in the WL embryos. 2) There is a wider distribution of fibronectin (FN) in the SK embryo than in the WL that also correlates with the enhanced dispersal of SK melanoblasts. 3) Entrance to the ventral pathways in SK embryos is through breaches in, or absence of, PNA barriers that are established in the WL embryos.

Ephrins Are Correlated with Extensive Melanoblast Dispersal in the SK Embryos

The SK fowl is a convenient and informative model system with which to understand the molecular basis of melanoblast morphogenesis since their migration is greatly expanded compared with the WL or Light Brown Leghorn (Faraco et al., 2001). The current studies reinforce the conclusion from previous work (Santiago and Erickson, 2002) that ephrin-Bs positively regulate melanoblast migration:

1. There is a strong correlation between the distribution and level of expression of ephrin-Bs and the rate and pattern of dispersal in the dorsolateral pathway. Although SK melanoblasts enter the dorsolateral path slightly later than WL melanoblasts, they rapidly catch up and then bypass the WL melanoblasts. This acceleration of dispersal is correlated with a dramatically higher concentration of ephrins that develops between stage 22 and 24. The wave front of melanoblasts is always at the leading edge of the expansion of ephrins.

2. The broad ventral distribution of melanoblasts in the SK embryo is correlated with the greatly expanded distribution of ephrins in both the anterior and posterior somite. Conversely the dearth of ephrin-Bs in the ventral pathways of the WL embryo is consistent with the absence of ventral melanoblast migration. These pathways in the SK embryos are often very specific. For example, there is a narrow

band of ephrins next to the neural tube and around the dorsal aorta and the SL-positive cells are precisely found in these regions (Fig. 4).

3. The SK fowl has a large concentration of pigment cells in the mesenteries suspending the gut and this is a region that is high in ephrin-Bs. In the WL, we believe the ephrins keep neural and glial precursors out of the thoracic-level gut. Given that there are no melanoblasts in the ventral WL embryo, the ephrins in the mesentery cannot promote the migration of melanoblasts.

4. Besides the correlative data above, our experimental results also indicate that ephrin-Bs promote melanoblast migration in both SK and WL embryos. We injected ephrin-B1-Fc into the amniotic sac, which offered several advantages over our previous experiments of culturing trunk pieces in ephrin fusion proteins (Krull et al., 1997; Santiago and Erickson, 2002). Chief amongst these is that the morphology of the experimental embryos is superior to the slice explants (compare with Fig. 5 in Santiago and Erickson, 2002), and it is likely that the physiological environment is closer to normal. In both SK and WL embryos, melanoblast migration halts at the entrance to the dorsolateral pathway, which is the approximate position of melanoblasts at the time of injection (see also Fig. 1).

In summary, the naturally occurring Silky mutation provides additional evidence that ephrin-Bs promote melanoblast migration.

What role do ephrins play in stimulating melanoblast migration? Our previous work showed that among several effects, ephrin signaling increases melanoblast adhesion to FN (Santiago and Erickson, 2002). It is thus interesting to note that there is considerably more FN immunolabeling in the SK embryo than in the WL. Specifically, not only is there enhanced FN labeling in the dorsolateral pathway, but also high concentrations of label beneath the myotome, which is one of the pathways taken by SK melanoblasts when they disperse ventrally. Thus, FN distribution is coincident with ephrin-Bs.

There Are Likely Overlapping Cues That Control Melanoblast Dispersal

The emerging picture is that morphogenesis is controlled by overlapping and redundant cues. Considerable evidence has been amassed to suggest that this is true for the neural crest (e.g. reviews by Wehrle-Haller and Weston, 1997; Krull, 2001; Erickson, 2003; Young et al., 2004). For example, ventrally migrating neuronal

and glial precursors are prevented from invading the dorsolateral pathway by the actions of ephrins (Santiago and Erickson, 2002), PNA-binding molecules (Oakley et al., 1994), Slits (Jia et al., 2005) and F-spondin (Debby-Brafman et al., 1999). Moreover, these regulatory molecules can be a mixture of positive and negative cues. For example, neural crest cells migrate through the anterior half of the somite and avoid the posterior half owing to barrier molecules in the posterior somite (ephrin-Bs, PNA-binding proteins, proteoglycans) and permissive molecules in the anterior somite, such as FN, laminin, and tenascin (Erickson and Perris, 1993; Erickson and Reedy, 1998; Krull, 2001).

Our results suggest that in addition to ephrins acting positively to regulate melanoblast migration in the SK embryo, inhibitory cues owing to PNA-binding molecules are lost, which permits melanoblasts to access to the ephrins. This cooperative action of ephrins and PNA is seen in both the dorsolateral and ventral pathways. In the dorsolateral path, as ephrins expand proximally to distally, PNA-binding is lost in a medial to lateral wave (Oakley et al., 1994). Thus as the marker for a negative cue retreats, ephrins expand in its wake. Similarly in the ventral pathway there is an expansion of positive ephrins and a loss of barrier molecules (see Fig. 4) in the SK embryo. For example, ephrin-B becomes concentrated between the neural tube and the somite, whereas PNA is distributed in such a way as to develop several PNA-free spaces allowing access to the ephrins. Additionally ephrins fill the perinotochordal mesenchyme and there are simultaneously breaches in the PNA barrier that underlies the myotome, which permit melanoblasts from the dorsolateral pathway to access the ephrins. This redundancy is also seen in the WL. For instance, there are few ephrins between the neural tube and somites and there is a band of PNA that develops about the time that melanoblasts begin to migrate that likely blocks migration ventrally (Faraco et al., 2001).

Nevertheless, there is not an invariant relationship between absence of PNA-binding and presence of ephrins. For example, in the WL occasionally there are some spaces between PNA labeling that could allow melanoblasts to move from the dorsolateral pathway medially. However, despite these spaces, there are no ephrins on which the melanoblasts can migrate so melanoblasts are still constrained to their dorsolateral position.

We attempted to perturb the PNA barrier function by injecting PNA-FITC into the amniotic cavity. Previous studies have suggested that application of PNA to tissue explants can interfere with the barrier function and allow neural crest cells to migrate into PNA-binding regions (Krull et al., 1995). We did not see any affect on melanoblast morphogenesis. Because the PNA is FITC labeled we know that it had access to the embryonic tissues because we could visualize it (see Figure 8). We do not know why Krull and colleagues saw an affect of PNA perturbation and we did not. One possibility is that they potentially used a higher concentration of PNA. Even though we and they used 100 μ g/ml, in our case the PNA may have been considerably diluted and therefore inadequate to block function. Alternatively the high concentration of PNA that they used may have had a non-specific effect. Another possibility is that even in the absence of one barrier there could be redundant cues to restrain melanoblast migration. Finally it could be that although PNA-binding glycoconjugates can act as a barrier to migration, this may not be a particularly strong cue. In support of this latter notion, when we grafted pigment cells into the migration staging area in stage-12 embryos, which is long before melanoblasts naturally embark on the dorsolateral path (stage 20), they were still able to invade the space precociously (Erickson and Goins, 1995), even though the PNA-binding molecules had not yet begun to disappear. Thus PNA-binding glycoconjugates may reinforce other negative cues, but by themselves may not be particularly strong.

What other cues might be regulating melanoblast migration in the Silky embryos? Endothelins are one possibility. Endothelins are 21-amino acid vasoactive peptides that bind to the EDNRB and EDNRB2 receptors in birds (Dupin and Le Douarin, 2003). The EDNRB receptor is expressed by the ventrally migrating neuronal and glial precursors, whereas EDNRB2 is expressed by melanoblasts only. The ligand for these receptors, endothelin 3 (ET3), is produced by the ectoderm and dermamyotome (Nataf et al., 1998). When Pla and coworkers (2005) expressed the EDNRB receptor in murine embryonic stem cells and then grafted the cells into early chick embryos, the stem cells migrated ventrally. If they grafted stem cells expressing the EDNRB2 receptor instead, the cells migrated dorsolaterally. These studies suggest that ET3 may attract melanoblasts into the dorsolateral path. Complementary data from the mouse show that in EDNRB knockout mice, neural crest cells migrate to the lip of the dermamyotome but do not advance into the skin

(Lee et al., 2003), resulting in pigment defects. Because of its inferred importance in normal melanoblast patterning, we are determining whether endothelins are expressed differently in the SK fowl.

A more complete understanding of the SK pigment phenotype will require the cloning and identification of the hypermelanosis gene. We are currently pursuing this goal.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. R. Boissy for the gift of Smyth-line serum. We are grateful to Da Granja Agroindustrial Ltda for providing the fertile WL chicken eggs. The B3/D6 monoclonal antibody developed by D.M. Fambrough was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242. PFF, MEB and FFF were supported by fellowships from CAPES, Brazil.

REFERENCES

Bronner-Fraser M. 1986. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Developmental Biology* 115:44-55.

Burns AJ, Le Douarin NM. 2001. Enteric nervous system development: analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. *The Anatomical Record* 262:16-28.

Debby-Brafman A, Burstyn-Cohen T, Klar A, Kalcheim C. 1999. F-Spondin, expressed in somite regions avoided by neural crest cells, mediates inhibition of distinct somite domains to neural crest migration. *Neuron* 22:475-488.

De Bellard ME, Rao Y, Bronner-Fraser M. 2003. Dual function of Slit2 in repulsion and enhanced migration of trunk, but not vagal, neural crest cells. *The Journal of Cell Biology* 162(2):269-279.

de Freitas PF, Ferreira FF, Faraco CD. 2003. PNA-positive glycoconjugates are negatively correlated with the access of neural crest cells to the gut in chicken embryos. *The Anatomical Record* 273A:705-713.

Dupin E, Le Douarin NM. 2003. Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. *Oncogene* 22:3016-3023.

Erickson CA. 2003. Patterning of the Neural Crest. In: Tickle C. *Patterning in Vertebrate Development*. Oxford: Oxford University Press. p 166-197.

Erickson CA, Goins TL. 1995. Avian neural crest cells can migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanocytes. *Development* 121:915-924.

Erickson CA, Perris R. 1993. The role of cell-cell and cell-matrix interactions in the morphogenesis of the neural crest. *Developmental Biology* 159:60-74.

Erickson CA, Reedy MV. 1998. Neural crest development: the interplay between morphogenesis and cell differentiation. *Current Topics on Developmental Biology* 40:177-209.

Faraco CD, Vaz SAS, Pástor MVD, Erickson CA. 2001. Hyperpigmentation in the Silkie fowl correlates with abnormal migration of fate-restricted melanoblasts and loss of environmental barrier molecules. *Developmental Dynamics* 220:212-225.

Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 88:49-92.

Hulley PA, Stander CS, Kidson SH. 1991. Terminal migration and early differentiation of melanocytes in embryonic chick skin. *Developmental Biology* 145:182-194.

Jia L, Cheng L, Raper J. 2005. Slit/Robo signaling is necessary to confine early neural crest cells to the ventral migratory pathway in the trunk. *Developmental Biology* 282:411-421.

Kitamura K, Takiguchi-Hayashi K, Sezaki M, Yamamoto H, Takeuchi T. 1992. Avian neural crest cells express a melanogenic trait during early migration from the neural tube: Observations with the new monoclonal antibody, "MEBL-1". *Development* 114:367-378.

Klein, R. 2001. Excitatory Eph receptors and adhesive ephrin ligands. *Current Opinion in Cell Biology* 13:196-203.

Krull CE. 2001. Segmental organization of neural crest migration. *Mechanisms of Development* 105:37-45.

Krull CE, Collazo A, Fraser SE, Bronner-Fraser M. 1995. Segmental migration of trunk neural crest: time-lapse analysis reveals a role for PNA-binding molecules. *Development* 121:3733-3743.

Krull CE, Lansford R, Gale NW, Collazo A, Marcelle C, Yancopoulos GD, Fraser SE, Bronner-Fraser M. 1997. Interactions of Eph-related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. *Current Biology* 7:571-580.

Kuklenski J. 1915. Über das vorkommen und die Verteilung des Pigments in den Organen und bei japanischen seiden Huhnern. *Archiv mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik* 87:1-37.

Le Douarin NM, Kalcheim C. 1999. *The Neural Crest*. 2nd Edition. Cambridge: Cambridge University Press. 445 p.

Le Douarin NM, Teillet MA. 1973. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 30(1):31-48.

Le Douarin NM, Teillet MA. 1974. Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of autonomic nervous system and of neuroectodermal

mesenchymal derivatives, using biological cell marking technique. *Developmental Biology* 41:162-184.

Lee HO, Levorse JM, Shin MK. 2003. The endothelin receptor-B is required for the migration of neural crest-derived melanocyte and enteric neuron precursors. *Developmental Biology* 259:162-175.

Makita T, Moshizuki S. 1984. Distribution of pigment cells in tissues of Silky fowl I: light microscopic observations. *Yamaguchi J Vet Med* 11:17-20.

Nakamoto, M. 2000. Eph receptors and ephrins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32:7-12.

Nataf V, Amemiya A, Yanagisawa M, Le Douarin NM. 1998. The expression pattern of endothelin 3 in the avian embryo. *Mechanisms of Development* 73:217-220.

Oakley RA, Lasky CJ, Erickson CA, Tosney KW. 1994. Glycoconjugates mark a transient barrier to neural crest migration in the chicken embryo. *Development* 120: 495-503.

Oakley RA, Tosney KW. 1991. Peanut agglutinin and chondroitin-6-sulfate are molecular markers for tissues that act as barriers to axon advance in the avian embryo. *Developmental Biology* 147:187-206.

Pla P, Alberti C, Solov'eva O, Pasdar M, Kunisada T, Larue L. 2005. *Ednrb2* orients cell migration towards the dorsolateral neural crest pathway and promotes melanocyte differentiation. *Pigment Cell Research* 18:181-187.

Reedy MV, Faraco CD, Erickson CA. 1998a. The delayed entry of thoracic neural crest cells into the dorsolateral path is a consequence of the late emigration of melanogenic neural crest cells from the neural tube. *Developmental Biology* 200:234-246.

Reedy MV, Faraco CD, Erickson CA. 1998b. Specification and migration of melanoblasts at the vagal level and in hyperpigmented Silkie chickens. *Developmental Dynamics* 213:476-485.

Santiago A, Erickson CA. 2002. Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration. *Development* 129:3621-3632.

Serbedzija GN, Bronner-Fraser M, Fraser SE. 1989. A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration. *Development* 106:809-816.

Wang H U, Anderson D J. 1997. Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron* 18:383-396.

Wehrle-Haller B, Weston JA. 1997. Receptor tyrosine kinase-dependent neural crest migration in response to differentially localized growth factors. *Bioessays* 19:337-345.

Young HM, Anderson RB, Anderson CR. 2004. Guidance cues involved in the development of the peripheral autonomic nervous system. *Autonomic Neuroscience* 112:1-14.

FIGURES

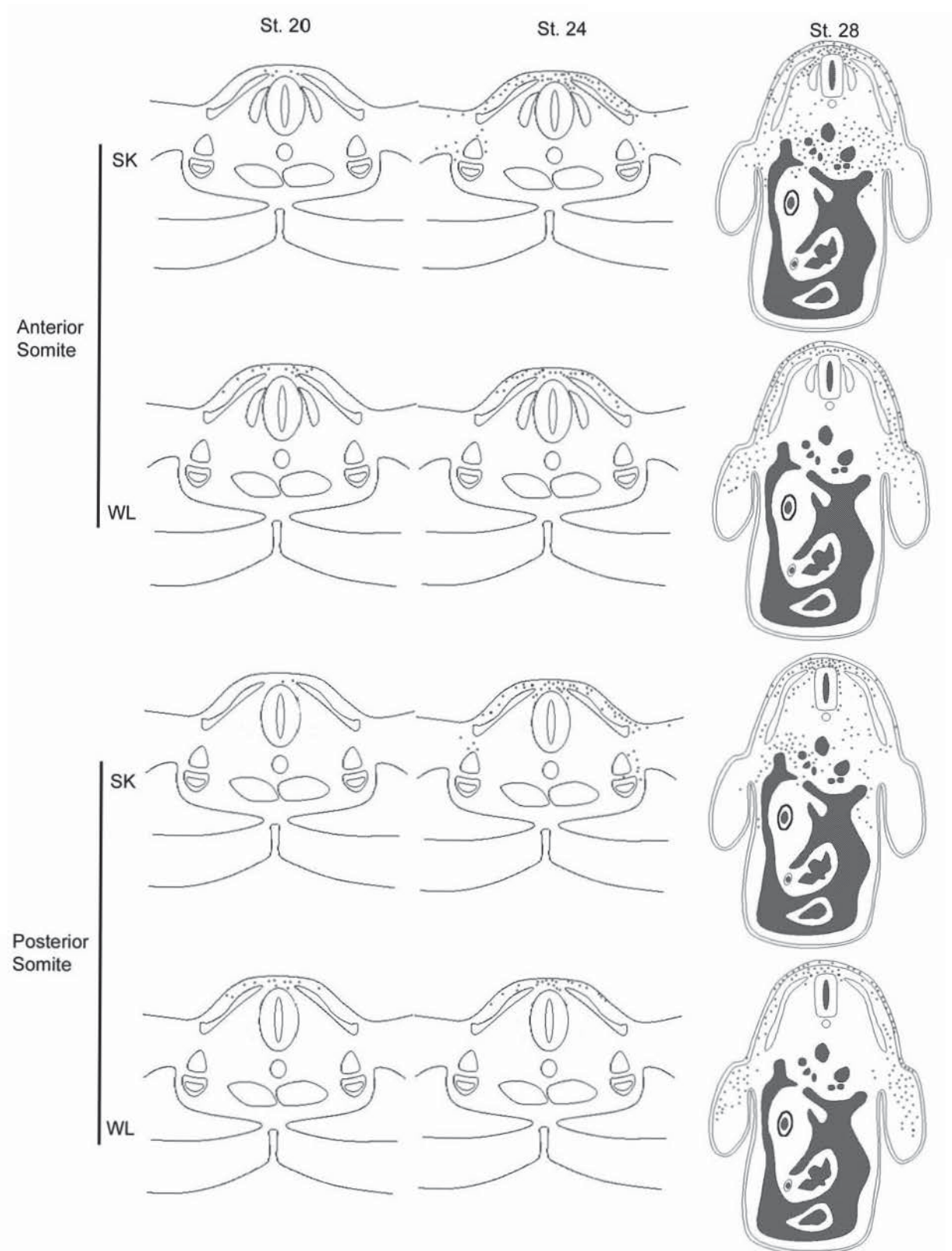


FIGURE 1- Schematic drawings of individual sections comparing the migration pattern of melanoblasts of SK and WL embryos at stages 20, 24 and 28. Each dot represents one cell.

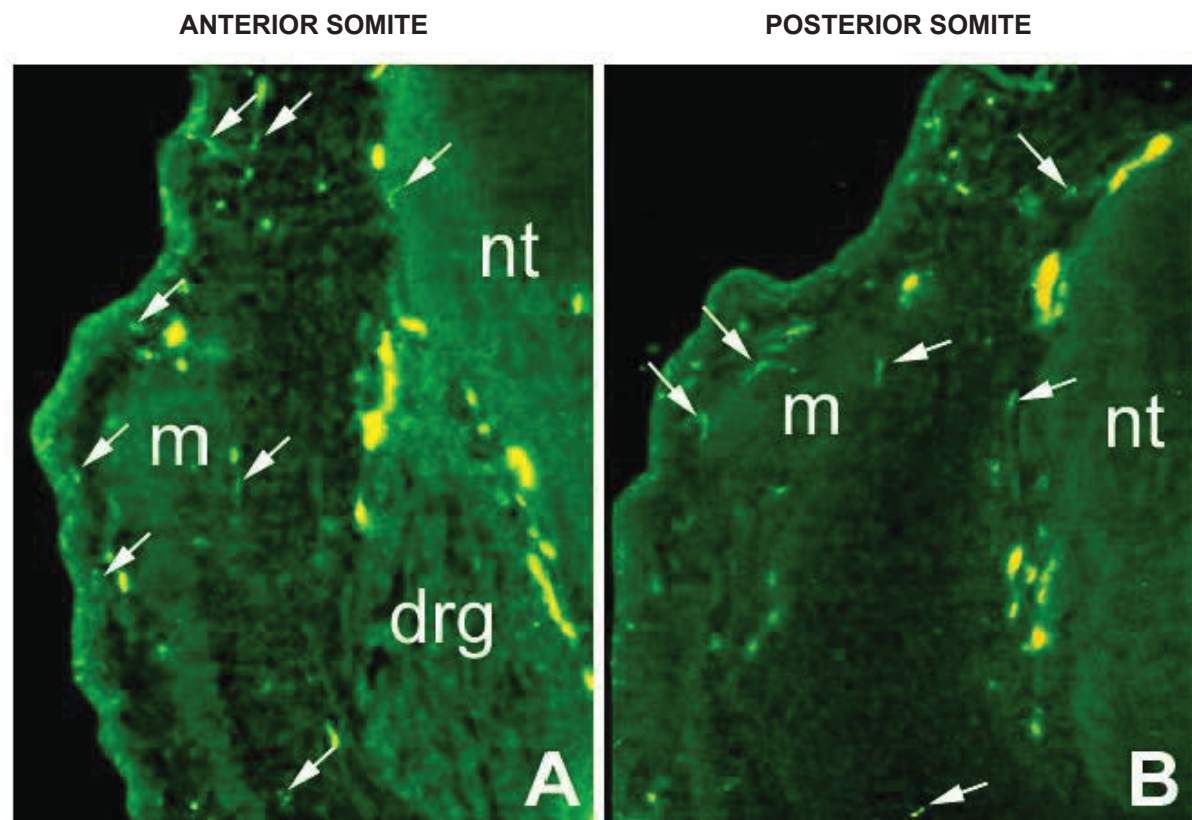


FIGURE 2- Sections through the thoracic level of SK embryos at stage 26 labeled with SL serum. SI-labeled cells (arrows) invade the ventral pathway in the anterior (A) and posterior somite (B). nt: neural tube; drg: dorsal root ganglion; m: myotome.

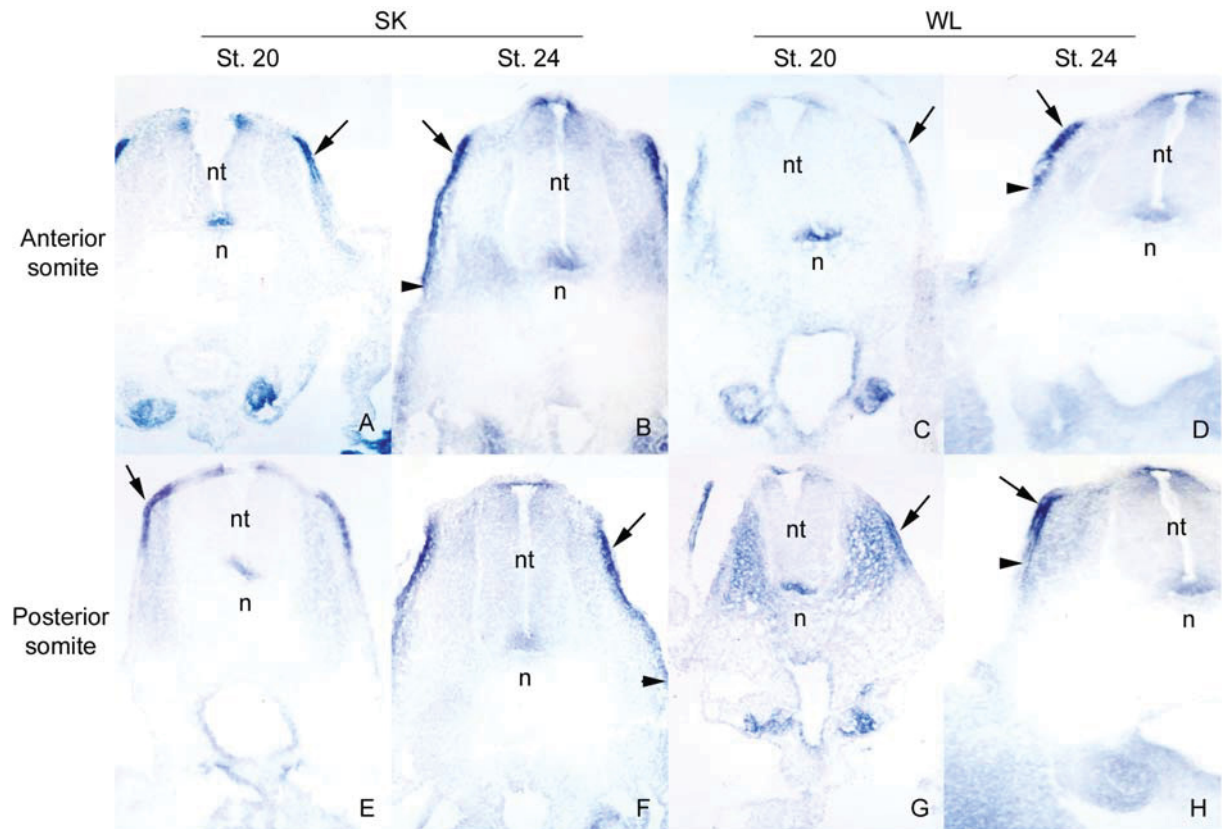


FIGURE 3- Sections through the thoracic level of SK and WL embryos at stages 20 and 24 labeled with EphB2-Fc to determine the distribution of ephrin-Bs. Note ephrin-B expression in the dorsolateral pathway in both strains (arrows). Arrowheads indicate the lateral limit of ephrin-B expression. nt: neural tube; n: notochord.

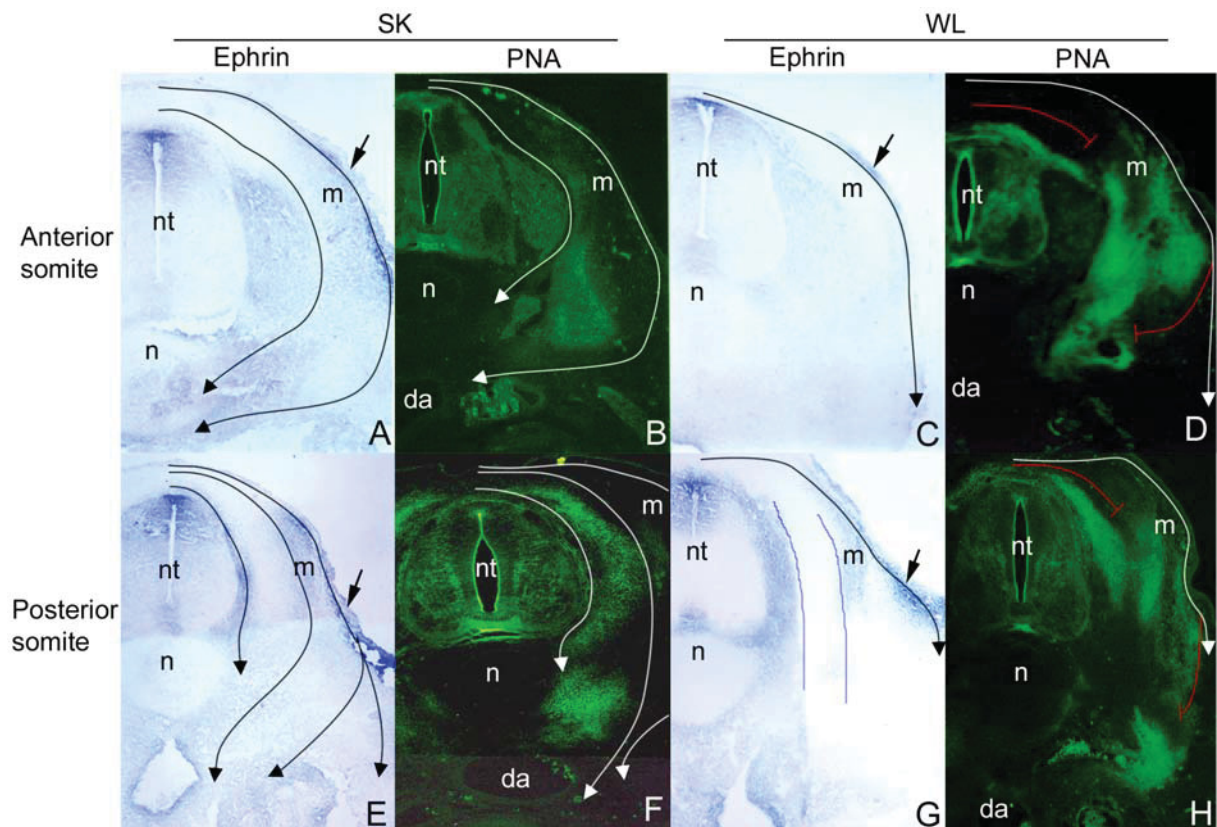


FIGURE 4- Sections through the thoracic level of SK (A, B, E and F) and WL (C, D, G and H) embryos at stage 28 labeled with EphB2-Fc and PNA-FITC lectin. Note that ephrin-Bs are distributed in the dorsolateral pathway in both strains (arrows) and in the ventral pathway in SK embryos (A and E). In WL embryos there are extensive ventral regions free of ephrin-Bs (e.g. area between lines in G). In SK embryos areas free of PNA-positive glycoconjugates generally correspond to the regions where ephrin is expressed (compare E and F). White and black lines indicate migratory pathways of melanoblasts, as determined from the mapping studies (e.g. Fig. 1; Fig. 8). Red lines represent SK melanoblast pathways that are blocked in WL. nt: neural tube; n: notochord; m: myotome; da: dorsal aorta.

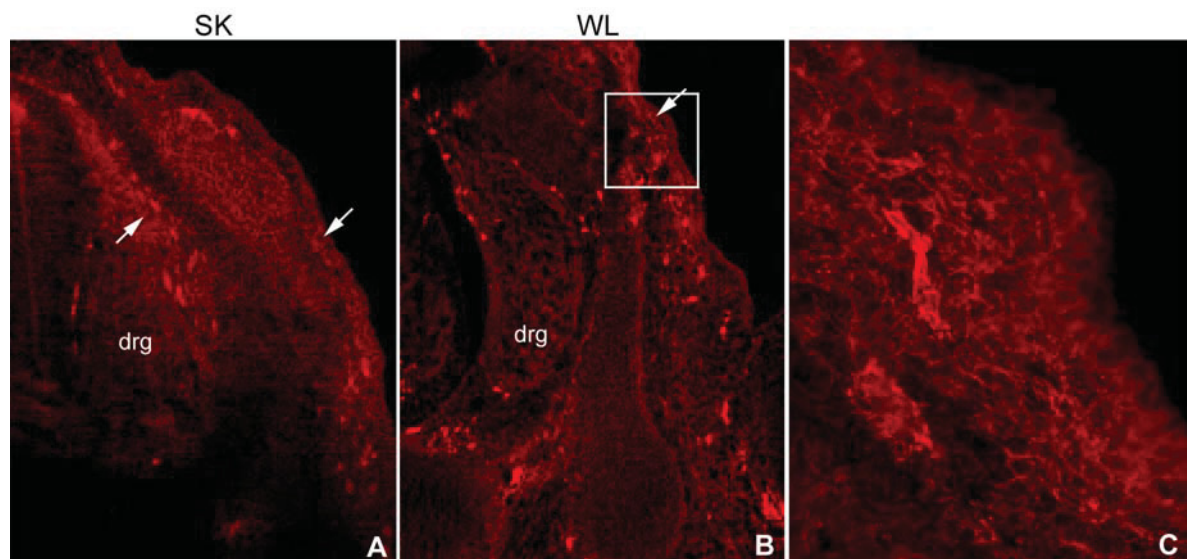


FIGURE 5- Sections through the thoracic level of SK (A) and WL (B) embryos at stage 28 labeled with antibody to fibronectin. C is a higher magnification of the boxed area in B. Fibronectin is widely distributed in the dorsolateral and ventral pathways in the SK embryo (arrows), but is primarily observed in the dorsolateral pathway in WL embryos (arrow). drg: dorsal root ganglion.

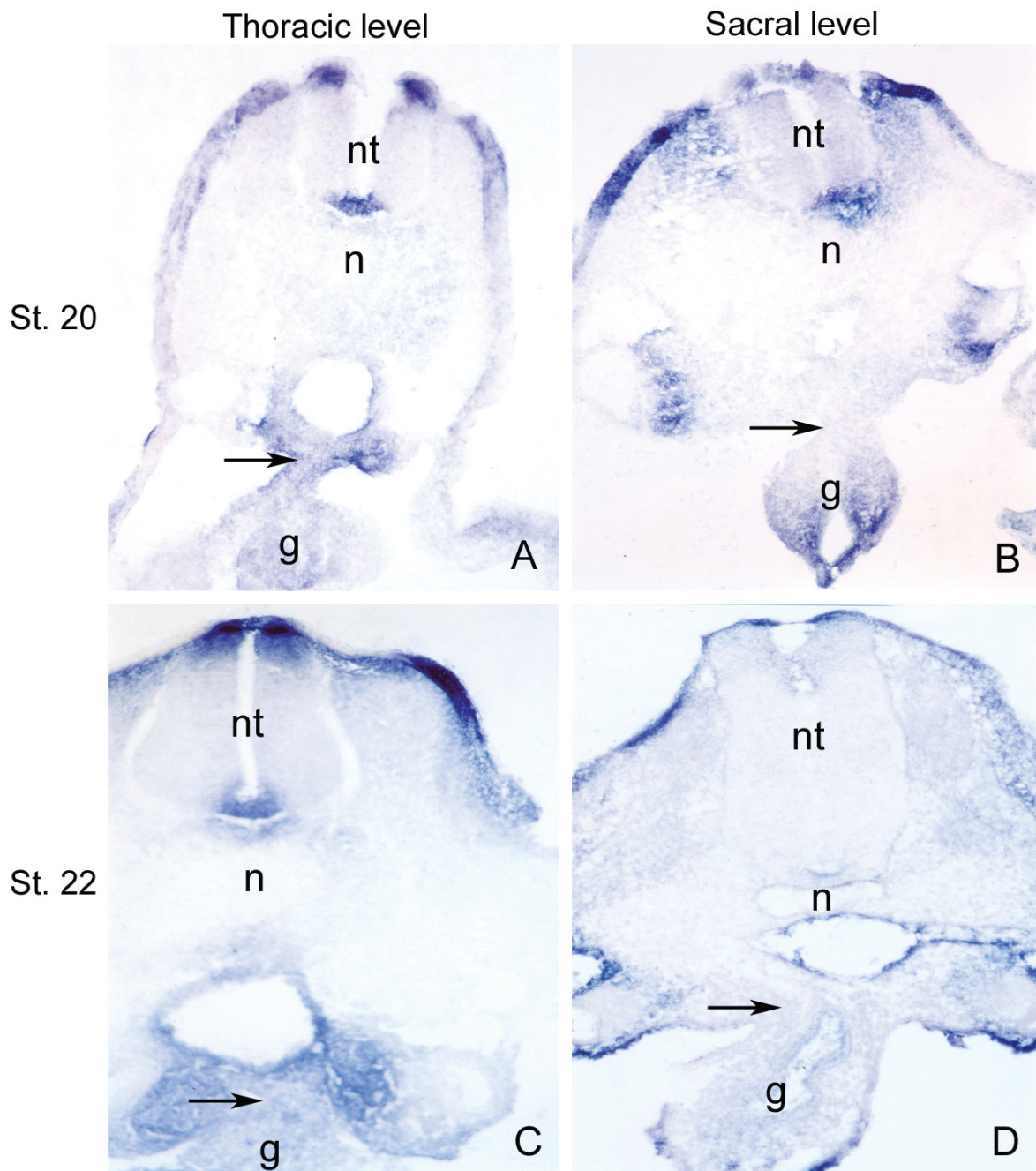


FIGURE 6- Sections through the thoracic (A and C) and sacral (B and D) level of SK embryos at stages 20 and 22 labeled with EphB2-Fc. The dorsal mesentery of the gut is ephrin-B-positive at the thoracic level (arrows in A and C), but ephrin-B-negative at the sacral level (arrows in B and D). nt: neural tube; n: notochord; g: gut.

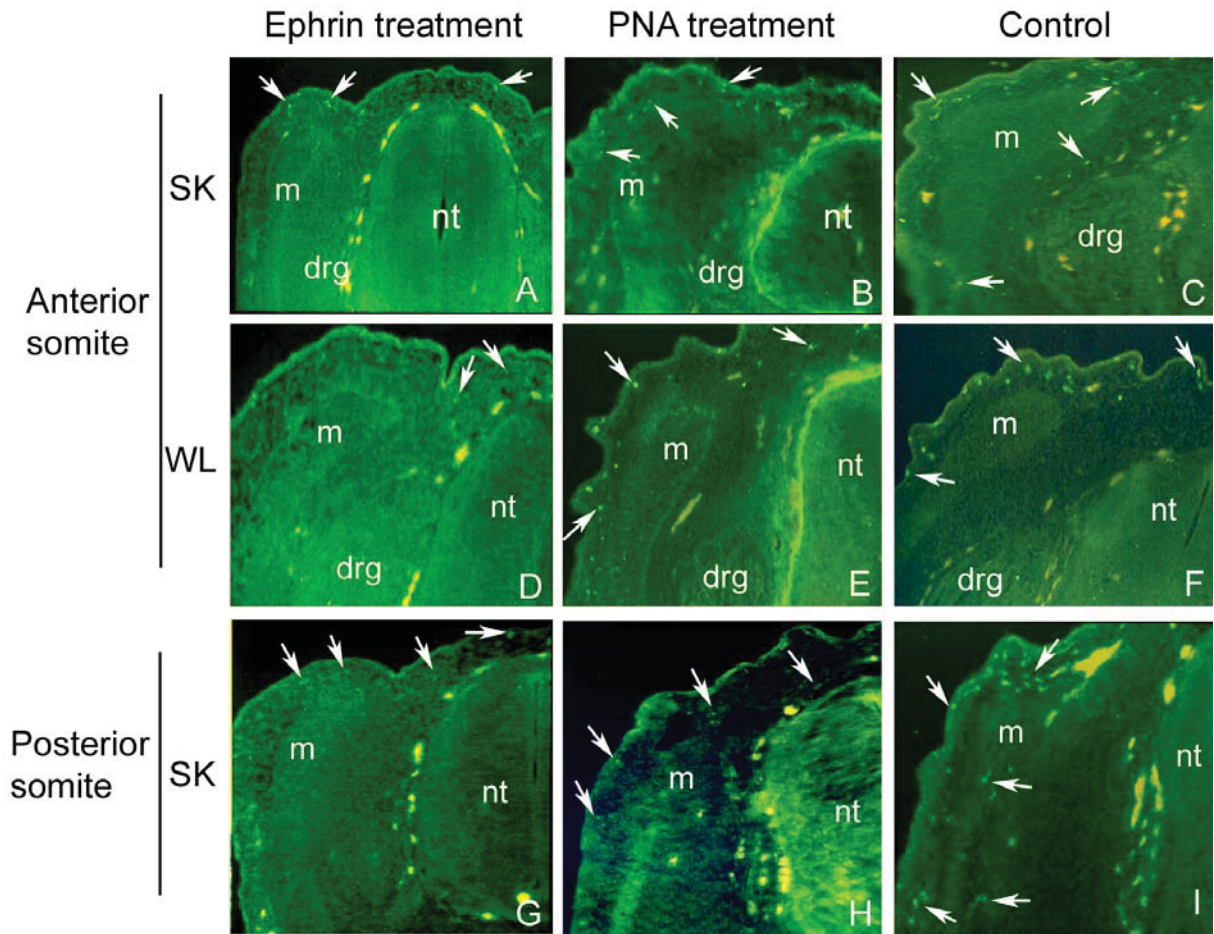


FIGURE 7- Sections through the thoracic level of SK (A, B, C, G, H and I) and WL (D, E and F) embryos at stage 28 labeled with SL serum after injection with ephrin-B1-Fc (A, D and G), PNA-FITC lectin (B, E and H) and PBS (C, F and I). White arrows: melanoblasts; nt: neural tube; drg: dorsal root ganglion; m: myotome.

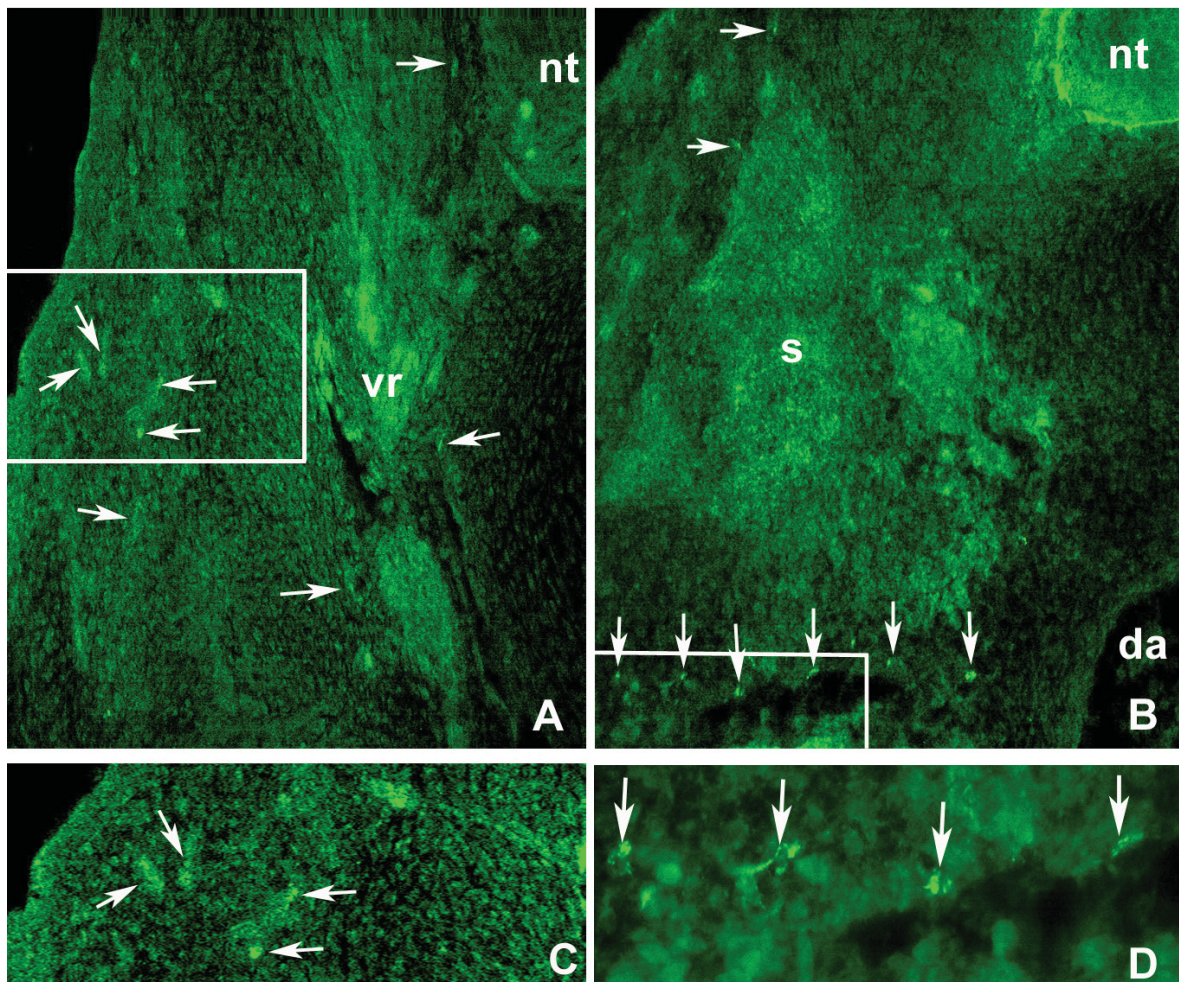


FIGURE 8- Sections through the thoracic level of SK embryos at stage 26-28 labeled with SL serum after injection with PNA-FITC. A: Control (PBS injected) with SL-labeled cells (arrows) following the dorsolateral and ventral route. B: SK embryos injected with PNA. SL-labeled cells (arrows) migrating medially. Note the PNA labeling on the sclerotome and around the neural tube. C: Higher magnification of the boxed area in A to show SL-labeled cells. D: Higher magnification of the boxed area in B to show SL-labeled cells. nt: neural tube; vr: ventral root; da: dorsal aorta; s: sclerotome.

CAPÍTULO 3

**MAPEAMENTO DA DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL,
DETECÇÃO DE LIGANTES EPHRINA-B E GLICOCONJUGADOS PNA-
POSITIVOS NA REGIÃO VAGAL**

RESUMO

Ao nível vagal as células da crista neural povoam diferentes regiões no embrião em três ondas migratórias: uma dorsolateral precoce, uma ventral e uma dorsolateral tardia. A população de células da primeira onda é denominada crista circunfaringeal e povoa os arcos branquiais contribuindo para o seu ectomesênquima e para o trato de efluxo do coração. As células que seguem o caminho ventral contribuem para o plexo aórtico e inervação entérica. As células da onda dorsolateral tardia são especificadas como melanoblastos. Diferentes moléculas estão envolvidas no direcionamento da crista neural. Ligantes ephrina-B estão relacionados com a inibição da migração para a linhagem neuronal, enquanto que para a linhagem melanocítica são descritos como estimuladores de migração. Glicoconjugados PNA-positivos estão localizados em áreas evitadas por células da crista neural, sendo relacionados com a inibição da migração. Utilizando injeções pontuais do corante vital Dil ao nível do somito 2 até 5, foi possível confirmar que ocorrem as três ondas migratórias, não sendo observadas diferenças no padrão de dispersão da crista neural nos 4 somitos analisados. As primeiras células que seguem a via dorsolateral se aglomeram ao redor da veia cardinal anterior. As células que seguem a via ventral migram através do esclerótomo logo adjacente ao dermatomo, contornam a aorta dorsal e mais tarde se posicionam em torno da faringe. A terceira onda ocorre através da via dorsolateral. Estes resultados foram confirmados com a utilização de imunomarcacão das células da crista neural com o anticorpo HNK-1. Com imunomarcacão para detecção de ligantes ephrina-B foi possível observar que os tecidos que compõem o caminho ventral seguido pela linhagem neuronal são sempre negativos para estes ligantes, que no entanto estão presentes na via dorsolateral em todos os estágios analisados (12-22). Com histoquímica para detecção glicoconjugados PNA-positivos observa-se que eles estão ausentes nos tempos e caminhos correspondentes a cada onda migratória, corroborando a sugestão do seu papel inibitório à migração da crista neural.

3.1. INTRODUÇÃO

Como descrito anteriormente, no Capítulo 1 deste trabalho, convencionou-se uma divisão das diferentes regiões da crista neural ao longo do eixo ântero-posterior. Inicialmente a região vagal foi descrita como correspondendo à área entre somitos 1 a 7 (LE DOUARIN & TEILLET, 1973; 1974). Mais recentemente tem-se referido a ela como a área compreendida do nível pós-ótico (posterior à vesícula ótica) até os cinco primeiros somitos. Desta forma, estão inseridos nesta região os rombômeros posteriores: r7 (ao nível do somito 1) e r8 (ao nível dos somitos 2 e 3) (LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999). Como se trata de uma região que sofre flexura à medida que o embrião segue seu desenvolvimento e conseqüente crescimento, torna-se difícil a descrição do posicionamento das estruturas que são formadas neste nível axial.

Nesta região foram descritos caminhos tomados pelas células da crista neural: um caminho lateral para dentro dos arcos branquiais 4-5, que é uma extensão do ectomesênquima cranial; um caminho lateral ao longo dos arcos aórticos que dará origem ao mesênquima do trato de efluxo do coração; um caminho de migração ventromedial para dentro da faringe e trato digestivo anterior que dará origem à inervação entérica e um movimento adicional em direção ventral rumo à aorta para formar o gânglio cervical superior; um caminho curto ventral que resulta na colonização de gânglios sensoriais craniais, e finalmente um caminho dorsolateral seguido pelos melanoblastos, precursores dos melanócitos (LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999). Estas descrições ocuparam-se mais do destino final das células, sem um estudo detalhado do tempo e padrão de migração ao nível vagal, como já descrito para os níveis cranial e do tronco. Além disso, existem controvérsias na literatura corrente com relação aos caminhos precisos seguidos pelos derivados ao nível vagal.

A região vagal está inserida numa faixa de transição entre a cabeça e o tronco, e muita controvérsia ainda existe com relação a este limite cabeça-tronco durante o desenvolvimento embrionário. Para alguns autores, o sulco circunfaringeal que representa o limite caudal da faringe, indica a interface cabeça-tronco ao nível da parede lateral do corpo. A crista neural pós-ótica (posterior à vesícula ótica)

localizada ao nível intermediário entre o tronco e a cabeça, dá origem a ambas populações da crista, a cefálica e a do tronco (KURATANI, 1997).

Mas tem sido mencionado que para a crista neural a interface cabeça-tronco reside ao nível dos somitos 3-4. Dados para a verificação deste conceito vêm de experimentos de transplantes com inversão de somitos e de injeções de Dil em embriões de galinha, em que se observou que as células da crista neural da região occipital anterior (somitos 1, 2 e 3) vão para os três arcos faríngeos posteriores, com algumas delas permanecendo próximas ao tubo neural para formar gânglios superior e jugular. Enquanto que as células da região occipital posterior (somitos 4 e 5) e do primeiro somito cervical (somito 6), não vão para os arcos faríngeos, mas migram num padrão que corresponde ao padrão de migração de crista neural observado na região do tronco, ventralmente através da metade anterior dos somitos (FERGUSON & GRAHAM, 2004). Os caminhos precisos e o período de migração destas populações, ainda não foram definidos.

No presente estudo foi realizado o mapeamento espacial e temporal da dispersão das células da crista neural ao nível dos somitos 2 a 5. Com os resultados obtidos foi possível confirmar a ocorrência de três ondas migratórias distintas. As células da primeira onda migratória (durante os estágios 9 a 13-14) percorrem a via dorsolateral se aglomerando ao redor da veia cardinal anterior. Durante a segunda onda migratória (entre os estágios 13 a 15), as células seguem pela via ventral, adjacentes os dermatomo, contornam a aorta dorsal e se dispõem ao redor da faringe. E por último ocorre uma terceira onda migratória através da via dorsolateral (se inicia no estágio 20). Além disto, foi possível observar que ocorre uma sobreposição temporal durante a primeira e a segunda onda migratória entre os estágios 13 e 14, e que não existem diferenças no padrão de dispersão das células da crista neural entre os somitos analisados. Estes dados foram obtidos através de injeções do corante vital Dil e confirmados com o uso de imunomarcagem das células da crista neural com o anticorpo HNK-1 em embriões de galinhas Leghorn.

Além do mapeamento das células da crista neural, foram realizadas marcações para detecção de ligantes ephrina-B e de glicoconjugados PNA-positivos neste nível axial de embriões de galinhas Leghorn nos estágios 11 a 22. Ligantes ephrina-B foram detectados no dermatomo, via dorsolateral, tubo neural e camadas

epiteliais do tubo digestivo de embriões em todos os estágios analisados. Somente em embriões no estágio 15 foi observada a presença de ligantes ephrina-B no mesênquima imediatamente ventral à aorta dorsal e veia cardinal anterior.

Os glicoconjugados PNA-positivos, em embriões nos estágios 12 a 14, estão presentes exclusivamente no esclerótomo medial, imediatamente adjacente a notocorda. Em embriões nos estágios 15, 16 e 17, além deste esclerótomo medial, a via dorsolateral também apresentou positividade para os glicoconjugados ligantes a PNA. Em embriões nos estágios 18 a 22 foi observada ausência de glicoconjugados PNA-positivos na via dorsolateral, enquanto que a região do esclerótomo, desde porções mediais até próximo ao dermatomo, se apresentou positiva para estes glicoconjugados.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES:

Foram utilizados ovos fertilizados de galinhas (*Gallus gallus*) da raça Leghorn, fornecidos pela Empresa Da Granja Agroindustrial Ltda.

Após higienização com esponja úmida, os ovos foram colocados na posição horizontal em incubadora, à temperatura de 38°C, com umidade e ventilação controladas. Os ovos permaneceram na incubadora até que atingissem os estágios 9 a 18 do desenvolvimento para injeções do corante vital Dil e estágios 12 a 22 para detecção de ligantes ephrina-B, glicoconjugados PNA-positivos e células da crista neural (segundo HAMBURGER & HAMILTON, 1951).

3.2.2. INJEÇÃO DO CORANTE VITAL (Dil) POR IONTOFORESE:

Os ovos foram desinfetados com etanol 70%, apoiados em um suporte de isopor, também desinfetado com etanol 70%, e então com agulha e seringa foi coletada parte da albumina (clara) através de um orifício aberto com a própria agulha na lateral da casca, para que o conteúdo não extravasasse ao ser feita a abertura da “janela”. A seguir foi colado um pedaço de fita adesiva na região da casca a ser aberta para que os fragmentos da casca não caíssem dentro do ovo. Com uma tesoura de ponta fina, foi recortada porção de casca por onde se teve acesso ao embrião para que fosse realizada a injeção.

O corante vital carbocianina lipofílica fluorescente Dil (1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato - Molecular Probes) foi diluído em etanol 100% na concentração de 0,5%, sendo esta conservada como solução estoque e no momento da utilização foi diluído em sacarose 0,3 M na concentração de 1:10 (SERBEDZIJA *et al.*, 1991).

Com a micropipeta posicionada na região da injeção, o pólo negativo de uma fonte elétrica de 9 volts conectado à albumina do ovo e o pólo positivo conectado ao eletrodo da micropipeta mergulhado diretamente no Dil, o circuito elétrico foi fechado

por 5 a 8 segundos (BRONNER-FRASER, 1996). As injeções foram realizadas na porção dorsal do tubo neural exatamente no nível de um único somito para cada embrião injetado, do somito 2 a 5. Importante salientar que o primeiro somito não apresenta um limite anterior definido e é transitório, estando presente somente até o estágio 14, quando deixa de ser morfologicamente distinto (HAMBURGER & HAMILTON, 1951; KURATANI & KIRBY, 1991), por este motivo no presente trabalho a injeção de Dil sempre foi realizada a partir do somito 2 (Ilustração 1).

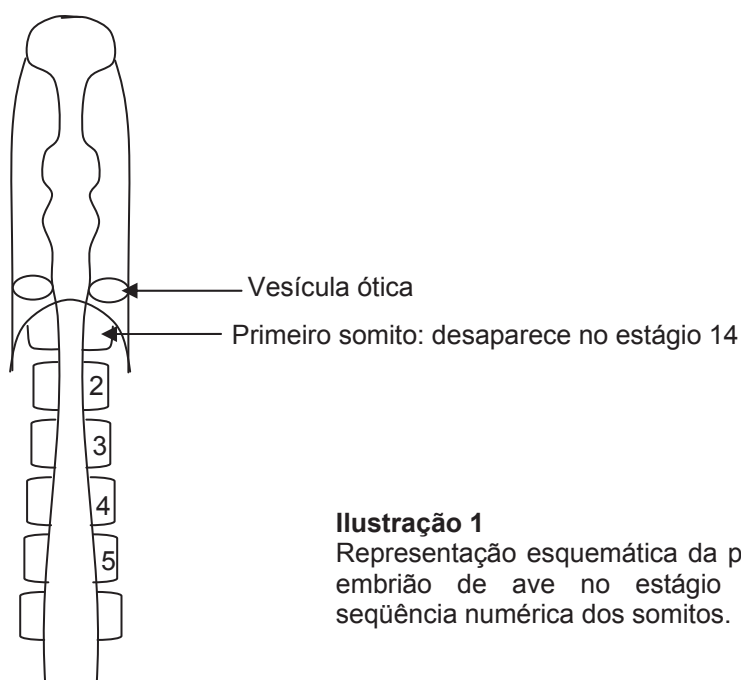


Ilustração 1

Representação esquemática da porção anterior de embrião de ave no estágio 10. Observe a seqüência numérica dos somitos.

Após a injeção, as “janelas” abertas nos ovos foram fechadas com a fita adesiva e os ovos retornaram à incubadora para que os embriões se desenvolvessem por mais 17 horas, 24 horas, e 48 horas. Todos os procedimentos para as injeções foram realizados em fluxo horizontal.

Os embriões foram removidos de suas cascas em solução salina tamponada com fosfato (PBS), fixados em paraformaldeído 4% por no mínimo 1 hora. Após a fixação, foram lavados por três vezes em PBS, então banhados em sacarose 5% (Merck) em PBS por duas horas e deixados até o dia seguinte em sacarose 15% em PBS na geladeira à 4°C. No dia seguinte, os embriões foram colocados em banho-maria a 37°C, numa solução contendo 15% de sacarose e 7,5% de gelatina (Sigma)

em PBS, a qual foi renovada a cada hora de quatro a seis vezes. Logo após, os embriões foram posicionados no molde de inclusão contendo esta última solução, então foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos no freezer (-20°C) até o momento da criomicrotomia.

Foram feitos cortes congelados de 16 μm em criostato modelo CTD-International-Harris-Cryostat-IEC. Os cortes foram montados em lâminas com 3 gotas de PBS e lamínulas, e observados imediatamente em microscópio de epifluorescência (Leica Dialux 20). Durante a observação foram construídos mapas esquemáticos ilustrando a posição de cada célula marcada com o corante. Cada mapa apresentado representa a somatória dos cortes analisados. Alguns exemplares foram ainda levados ao fotomicroscópio de epifluorescência (Zeiss Axiophot), onde foram capturadas imagens das células marcadas utilizando o software Case Data Manager.

3.2.3. IMUNODETECÇÃO DE LIGANTES EPHRINA-B:

Os embriões foram coletados em PBS gelado (em placa de Petri sobre gelo) e recortados na sua região vagal. Estes segmentos foram incluídos em meio para congelamento (Tissue-tek ou TBS), congelados em freezer a -20°C e seccionados transversalmente com 16 μm em criostato modelo CTD-International-Harris-Cryostat-IEC.

Os cortes foram fixados em paraformaldeído 4% por 3 minutos na lâmina, lavados em PBS e bloqueados em BSA 1% (Sigma) em PBS, incubados em quimeras receptor EphB2 conjugado a porção Fc de IgG humana (rmEphB2 chimera R&D Systems – Minneapolis-USA) por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida os cortes foram lavados em PBS, fixados novamente durante 1 hora, e após nova lavagem em PBS, aquecidos a 65-70°C para inativação da fosfatase alcalina endógena. Após lavagens em PBS, os cortes foram incubados em anticorpo secundário de cabra, anti-IgG humana conjugado a fosfatase alcalina (goat anti-human IgG + AP Promega – Madison-USA) durante 1 hora a temperatura ambiente e em seguida, a presença da enzima foi revelada com exposição dos cortes a

solução tampão fosfato pH 9,5 + NBT (Sigma) + BCIP (Sigma). Após revelação de 1-2 horas a temperatura ambiente, foram realizadas a fixação, lavagem, desidratação em série crescente de etanol, diafanização em xilol e montagem das lâminas com resina Permount. Estes cortes foram fotografados com câmera fotográfica digital Sony DSC-W5, Cyber-Shot 5,1 megapixels (zoom de 2,4x e resolução de 1 megapixel) acoplada a microscópio de luz American Optical-Spencer.

3.2.4. DETECÇÃO DE GLICOCONJUGADOS PNA-POSITIVOS E CÉLULAS DERIVADAS DA CRISTA NEURAL:

Os embriões foram coletados em PBS, recortados na sua região vagal e esses segmentos foram fixados por 1 hora em solução Bouin e depois lavados e armazenados em etanol 70%. Após a desidratação em série crescente de etanol (70, 80, 95 e 100%), os segmentos de embriões foram incluídos em Paraplast (Fischer), e então cortados transversalmente na espessura de 6 μ m em micrótomo Minot. Os cortes, em sequência da região mais anterior para a mais posterior, foram montados em lâminas gelatinizadas. As lâminas contendo os cortes foram guardadas em geladeira (a 4°C) até sua utilização.

Os cortes foram desparafinizados em estufa a 56°C por 1 hora e banhados em xilol por mais 1 hora, e então reidratados em série decrescente de etanol (100, 95, 70 e 50%) e água destilada por 5 minutos em cada solução. Estes cortes foram lavados 2 vezes em PBS e uma vez em PBS + glicina 0,1 M por 5 a 10 minutos cada banho, bloqueados em uma solução de BSA 1% por 15 minutos e incubados com o anticorpo primário (sobrenadante de hibridoma HNK-1, gentilmente cedido pela Dr^a Carol A. Erickson) em câmara úmida na geladeira à 4°C até o dia seguinte. Após incubação no anticorpo primário, os cortes foram lavados 3 vezes em PBS por 10 minutos cada banho, incubados no anticorpo secundário (anti-IgM de camundongo conjugado com rodamina da Chemicon, Temecula, CA) na concentração de 1:100 em PBS por 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente, lavados 3 vezes em PBS por 10 minutos cada banho. Os cortes foram novamente bloqueados com uma solução de soro de cabra 2% e BSA 0,5% em PBS por 15 minutos, incubados em aglutinina de amendoim conjugada diretamente com fluoresceína (PNA-FITC)

(OAKLEY *et al.*, 1994) (Vector cat#FL-1071) na concentração de 1:200 em tampão *bloqueador* à temperatura ambiente em câmara úmida, lavados 3 vezes em PBS por 10 minutos e montados com meio de montagem para fluorescência, e observadas imediatamente ou estocadas a 4°C, na ausência de luz, para posterior análise e tomada fotográfica em microscópio de epifluorescência (Leica Dialux 20) com filtros de fluoresceína e rodamina. Lâminas controle foram omitidas da incubação com o anticorpo primário (HNK-1) e banhadas em galactose 200 mM para inibição dos radicais de açúcares, previamente ao tratamento com a aglutinina de amendoim (PNA).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. INJEÇÕES DE Dil E IMUNOMARCAÇÃO DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL

Foram realizadas injeções pontuais de Dil na região dorsal do tubo neural de embriões em diferentes estágios do desenvolvimento (estágios 9 a 18 HH) para o mapeamento das células da crista neural. Cada embrião foi injetado exclusivamente no nível de um somito em particular, desde o somito 2 até 5. Após retorno e permanência na incubadora por mais 17 a 48 horas, estes embriões foram coletados, fixados, embebidos em gelatina, cortados seriadamente e observados sob microscópio de epifluorescência. Além das injeções de Dil, foi realizada a imunomarcação de células da crista neural com o anticorpo HNK-1 em cortes histológicos da região vagal de embriões do estágio 12 até o 22 (HH).

Primeira onda de migração: via dorsolateral – Crista circunfaringeal

Estudos anteriores descrevem uma subpopulação de células da crista neural, a crista circunfaringeal, que migra dorsolateralmente, entre ectoderme e dermátomo, e contribui para o trato de efluxo cardíaco (KURATANI & KIRBY, 1991; 1992). Neste estudo foi possível observar que a formação da crista circunfaringeal ocorre em embriões injetados entre os estágios 9 e 12 em todos os somitos analisados (Fig. 1A-E; 2A-D; 3A e B; 4A-C). Esta população de células marcadas por Dil se localiza ao redor da veia cardinal anterior, preferencialmente ocupando seu aspecto dorsolateral, próximo da parede lateral do corpo. Poucas células são observadas ocupando esta região característica anteriormente descrita para crista circunfaringeal (KURATANI & KIRBY, 1991; 1992) em embriões injetados nos estágios 13 (Fig. 1F; 3C) e 14 (Fig. 3D). Células da crista neural são vistas ocupando a via dorsolateral de migração somente em embriões coletados até o estágio 14 após a injeção entre os estágios 9 e 12 (Fig. 1C). Em embriões imunomarcados com HNK-1 no estágio 12 são observadas células da crista neural ocupando exclusivamente a via dorsolateral (Fig. 6A-C). No estágio 13 as células HNK-1 positivas ocupam ainda a via dorsolateral e já iniciaram a invasão da via ventral (Fig. 6D e E). Em embriões no

estágio 14 observam-se células HNK-1 positivas aglomeradas na região ao redor da veia cardinal anterior, enquanto outras ocupam a via ventral de migração, agora em maior número do que no estágio anterior (Fig. 6F). Destes resultados é possível concluir que a primeira onda de migração através do caminho dorsolateral ocorre entre os estágios 9 e 12 sendo menos significativa nos estágios 13 e 14.

Segunda onda de migração: via ventral – Precursores gliais e neuronais

Células da crista neural que seguem a rota ventral de migração, entre o tubo neural e o dermátomo, constituem uma população de precursores gliais e neuronais do Sistema Nervoso Periférico (LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999). Em embriões injetados desde o estágio 9 até o estágio 14 e coletados após o estágio 13 tardio, é possível observar células da crista neural ocupando a via ventral de migração em todos os somitos analisados (Fig. 1A-G; 2B-F; 3A-D; 4; Fig 5A-C). Este resultado foi confirmado com a imunomarcação das células da crista neural com o anticorpo HNK-1, em que a partir do estágio 13 é possível observar células ocupando a porção inicial da via ventral numa pequena quantidade neste estágio, que é aumentada a partir do estágio seguinte (Fig. 6). As células da crista neural que migram através do caminho ventral, primeiro seguem ventralmente através do esclerótomo, adjacentes ao dermátomo (Fig. 5A e B). Quando alcançam o nível horizontal imediatamente abaixo ao nível da notocorda, correspondente ao nível da porção final do dermátomo, elas se desviam das proximidades do dermátomo, seguindo medialmente (Fig. 5C; 6G) e ocupando os arredores da aorta dorsal. Em seguida, se espalham ventralmente chegando na periferia dorsal da faringe. Então algumas destas células contornam a faringe, ocupando uma posição ventrolateral à faringe, enquanto outras permanecem dorsais à faringe. Assim as primeiras células da crista neural que migram ventralmente se posicionam no entorno da faringe (Fig. 1A-E; 2B-F; 3A, B e D; 4). Nestas posições (ao redor da aorta dorsal e faringe) estas células de origem ventral acabam por se misturar àquelas da crista circunfaringeal que estão ao redor da veia cardinal, não sendo possível distinguir exatamente uma população da outra, por sua proximidade física (Fig. 1A-E; 2B-D; 3A e B; 4A-D).

Em embriões injetados após o estágio 16 não são observadas células ocupando a via ventral de migração (Fig. 1H e I; 3E-G), podendo isto indicar que as

células que seguem por essa via emigram do tubo neural antes deste estágio. Em cortes de embriões no estágio 15 imunomarcados com HNK-1, é possível observar células ocupando a via ventral de migração e algumas na porção lateral da aorta dorsal (Fig. 6G).

Algumas das células da crista neural que migram através da via ventral ao nível vagal dão origem ao Sistema Nervoso Entérico, referida como crista entérica (LE DOUARIN & TEILLET, 1973; 1974). Em cortes de embriões nos estágios 16 e 17, algumas das células HNK-1 positivas já estão localizadas no mesênquima da entrada do tubo digestivo enquanto outras estão espalhadas ocupando toda a extensão da via ventral, desde a região lateral à porção dorsal do tubo neural até o nível da aorta dorsal (Fig. 6H-I).

Terceira onda de migração: via dorsolateral – Precursores melanocíticos

Em embriões mais tardios (estágio 20 em diante) foi descrita anteriormente uma onda de migração através da via dorsolateral em que as células são especificadas como melanócitos (REEDY *et al.*, 1998).

Em embriões injetados a partir do estágio 16 não são observadas células da crista neural ocupando a via ventral, mas sim células aglomeradas abaixo da ectoderme ocupando a porção dorsal do embrião (em embriões coletados até o estágio 20 – Fig. 1H) e já seguindo a via dorsolateral (em embriões coletados do estágio 21 em diante – Fig. 1B e I; 3E-G; Fig 5D-F).

3.3.2. DETECÇÃO DE LIGANTES EPHRINA-B E DE GLICOCONJUGADOS PNA-POSITIVOS

Outros embriões (estágios 11 a 22 HH) foram processados especificamente para detecção de ligantes ephrina-B ou de glicoconjugados PNA-positivos, além de células derivadas da crista neural, seguida da análise e tomada fotográfica dos cortes marcados em microscópio de luz (ephrina-B) ou de epifluorescência (glicoconjugados PNA-positivos e células da crista neural).

Padrão de distribuição de ligantes ephrina-B na região vagal

Analisando-se os cortes marcados para ligantes ephrina-B, é possível observar que em embriões no estágio 11 não há marcação positiva. Esta só se inicia no estágio 12 no dermatômo, espaço correspondente à via dorsolateral, tubo neural e camadas epiteliais do tubo digestivo (Fig. 7A). Ela se mantém fraca até o estágio 14 (Fig. 7B e C). No estágio 15 a marcação positiva se torna mais intensa e é possível observar que, além das áreas já descritas como positivas para ligantes ephrina-B, o mesênquima abaixo da aorta dorsal, que é a entrada para o tubo digestivo, e o da região ao redor da veia cardinal, também se tornam positivos, porém em menor intensidade se comparado com o dermatômo e as camadas epiteliais do tubo digestivo (Fig. 7D-F). A marcação positiva para ligantes ephrina-B se mantém no tubo neural, via dorsolateral, dermatômo e parede do trato digestório (apenas nas camadas epiteliais, nunca na região mesenquimal) até o estágio 22 (Fig. 7G-P). O padrão de distribuição destes ligantes ao nível vagal (do somito 1 ao 7) se repete desde o estágio 12 até o estágio 22, com uma única exceção no estágio 15 (Fig. 7).

Distribuição de glicoconjugados PNA-positivos na região vagal

Da análise da distribuição de glicoconjugados PNA-positivos e células derivadas da crista neural é possível observar os seguintes resultados. No estágio 12-13 não há marcação positiva para glicoconjugados PNA-positivos na via de migração dorsolateral e existem células HNK-1 positivas ocupando essa via (Fig. 8A e B). Neste estágio a presença de glicoconjugados PNA-positivos é observada exclusivamente ao redor da notocorda e pouco no mesênquima imediatamente adjacente à notocorda (Fig. 8A). No estágio 14 células HNK-1 positivas são observadas ocupando a via ventral de migração e a região latero-dorsal à veia cardinal (Fig. 8D), uma posição característica de células da crista circunfaringeal (KURATANI & KIRBY, 1991; 1992). A via dorsolateral continua negativa para glicoconjugados no estágio 14, e estes começam a aparecer levemente na região do esclerótomo, porém em porções mais mediais em torno da notocorda (Fig. 8C). Em porções mais laterais (próximas ao dermatômo) a marcação é negativa (Fig. 8C). No

estágio 15 os glicoconjugados PNA-positivos começam ser detectados na via dorsolateral (Fig. 8E). As células ocupam a via ventral e algumas se aglomeram nas laterais da aorta dorsal (Fig. 8F). Neste estágio o esclerótomo continua positivo para glicoconjugados na região medial, próxima da notocorda, e as células presentes na via ventral se localizam mais próximas ao dermatomo, onde a marcação é menos intensa (Fig. 8E e F). No estágio 16, as células já alcançam o mesentério dorsal do tubo digestivo, o qual é negativo para glicoconjugados PNA-positivos. O padrão de marcação dos glicoconjugados no esclerótomo e da distribuição das células HNK-1 positivas pela via ventral exibidos no estágio 15 se repetem no estágio 16 (Fig. 8H e G). A via dorsolateral, neste estágio é positiva para glicoconjugados PNA-positivos (Fig. 8G). E esta marcação positiva só desaparece desta via no estágio 18 (Fig. 8 K), quando é possível notar que as estruturas derivadas das células de linhagem neuronal da crista neural já estão estabelecidas (ex.: gânglio transitório de Froriep – Fig. 8 L). No esclerótomo, a partir do estágio 18, é possível observar marcação positiva para glicoconjugados PNA-positivos ocupando uma extensão maior, desde regiões mediais, arredores da notocorda e aorta dorsal, até regiões mais laterais próximo ao dermatomo (Fig. 8 K, M e O). Nos estágios, 18-19, observa-se que células HNK-1 positivas já se encontram ocupando a região do mesênquima da parede do tubo digestivo (Fig. 8L e N). Do estágio 20 em diante é possível observar células da crista neural ocupando a via dorsolateral (Fig. 8P, seta), a qual está negativa para glicoconjugados PNA-positivos desde o estágio 18 (Fig. 8 K, M e O). Este padrão se repete até o estágio 22 (Fig. 8 K, M e O) em todos os somitos analisados (1 a 7).

FIGURAS

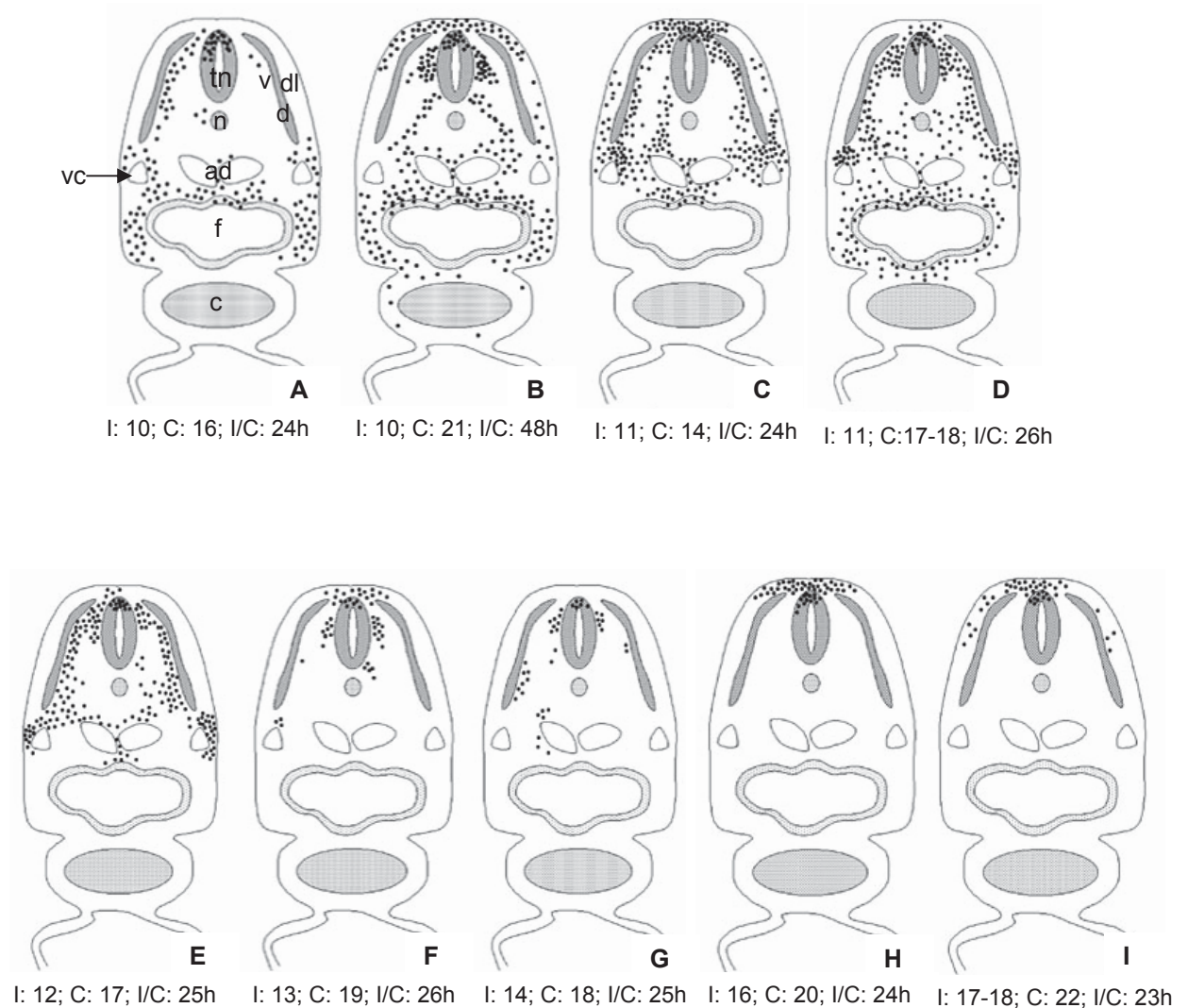


FIGURA 1- Mapas esquemáticos de cortes de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento injetados com Dil ao nível do **somito 2**. Cada ponto representa a posição de uma célula corada pelo Dil. tn: tubo neural, n: notocorda, ad: aorta dorsal, vc: veia cardinal anterior, d: dermatomo, f: faringe, c: região cardíaca, v: via ventral, dl: via dorsolateral, I: estágio em que foi realizada a injeção, C: estágio em que o embrião foi coletado após a injeção, I/C: tempo decorrido entre a injeção e a coleta do embrião.

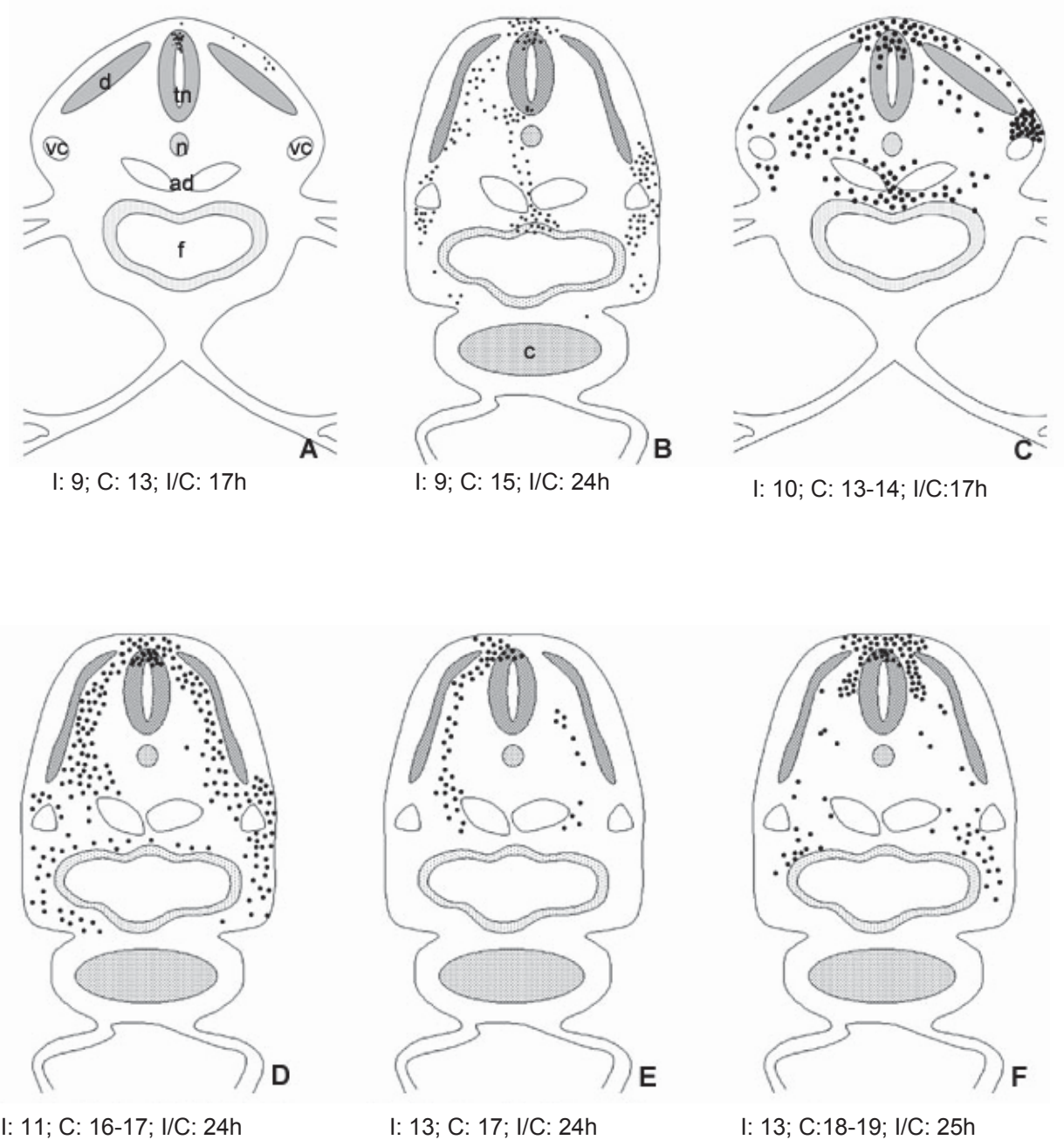


FIGURA 2- Mapas esquemáticos de cortes de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento injetados com Dil ao nível do **somito 3**. Cada ponto representa a posição de uma célula corada pelo Dil. tn: tubo neural, n: notocorda, ad: aorta dorsal, vc: veia cardinal anterior, d: dermatomo, f: faringe, c: região cardíaca, v: via ventral, dl: via dorsolateral, I: estágio em que foi realizada a injeção, C: estágio em que o embrião foi coletado após a injeção, I/C: tempo decorrido entre a injeção e a coleta do embrião.

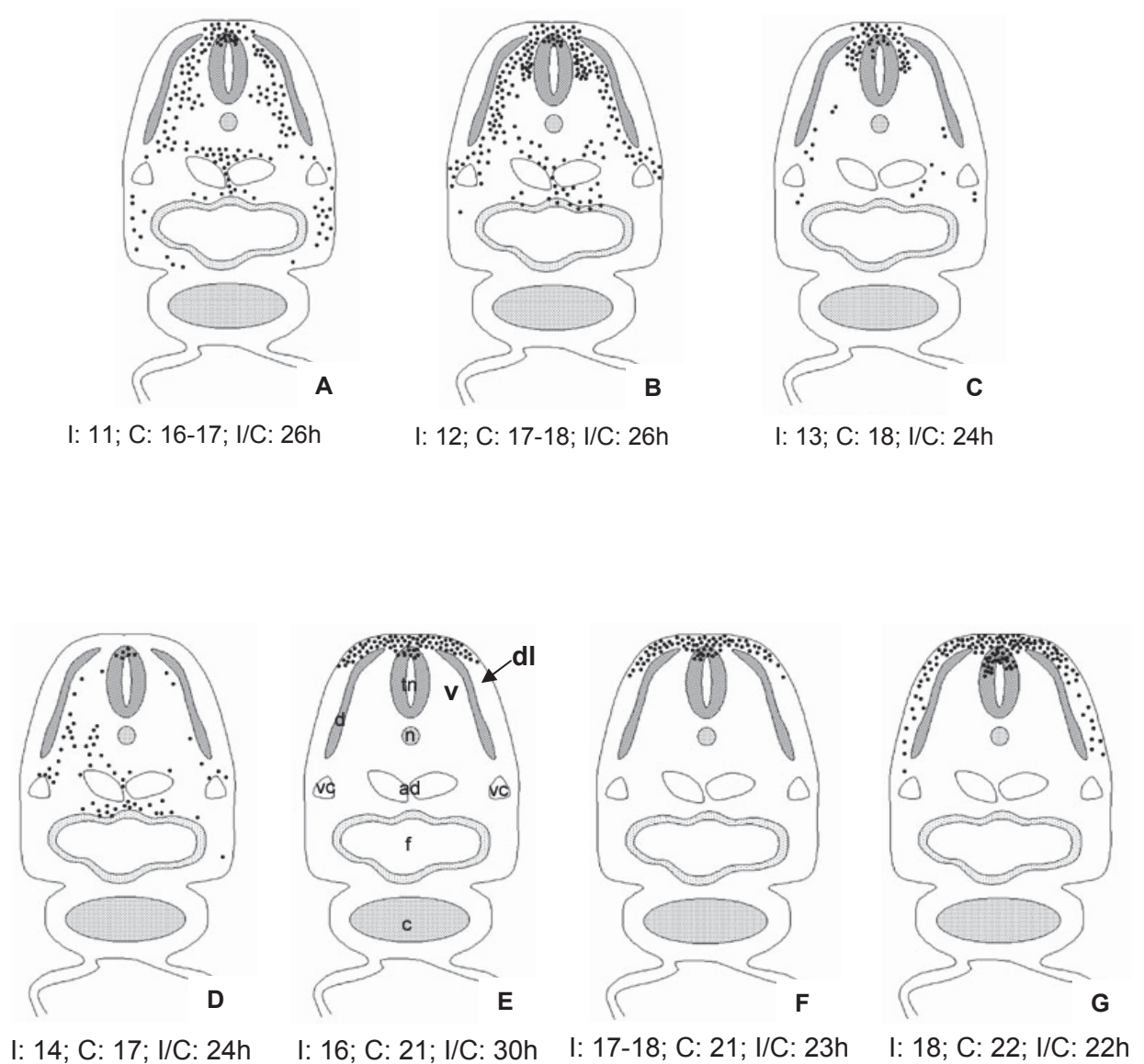


FIGURA 3- Mapas esquemáticos de cortes de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento injetados com Dil ao nível do **somito 4**. Cada ponto representa a posição de uma célula corada pelo Dil. tn: tubo neural, n: notocorda, ad: aorta dorsal, vc: veia cardinal anterior, d: dermatomo, f: faringe, c: região cardíaca, v: via ventral, dl: via dorsolateral, I: estágio em que foi realizada a injeção, C: estágio em que o embrião foi coletado após a injeção, I/C: tempo decorrido entre a injeção e a coleta do embrião.

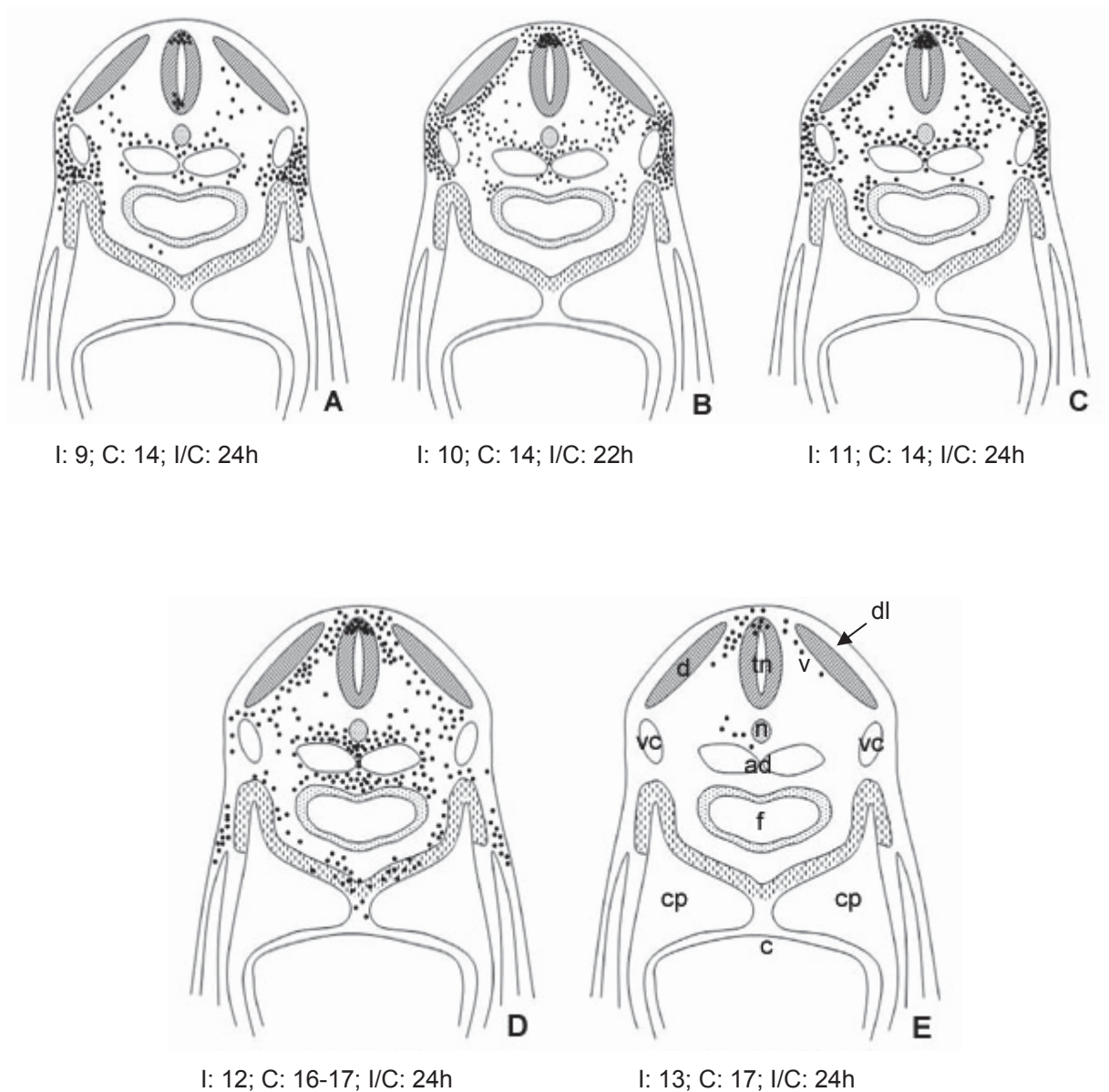


FIGURA 4- Mapas esquemáticos de cortes de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento injetados com Dil ao nível do **somito 5**. Cada ponto representa a posição de uma célula corada pelo Dil. tn: tubo neural, n: notocorda, ad: aorta dorsal, vc: veia cardinal anterior, d: dermatomo, f: faringe, c: região cardíaca, cp: cavidade pericardial, v: via ventral, dl: via dorsolateral, I: estágio em que foi realizada a injeção, C: estágio em que o embrião foi coletado após a injeção, I/C: tempo decorrido entre a injeção e a coleta do embrião.

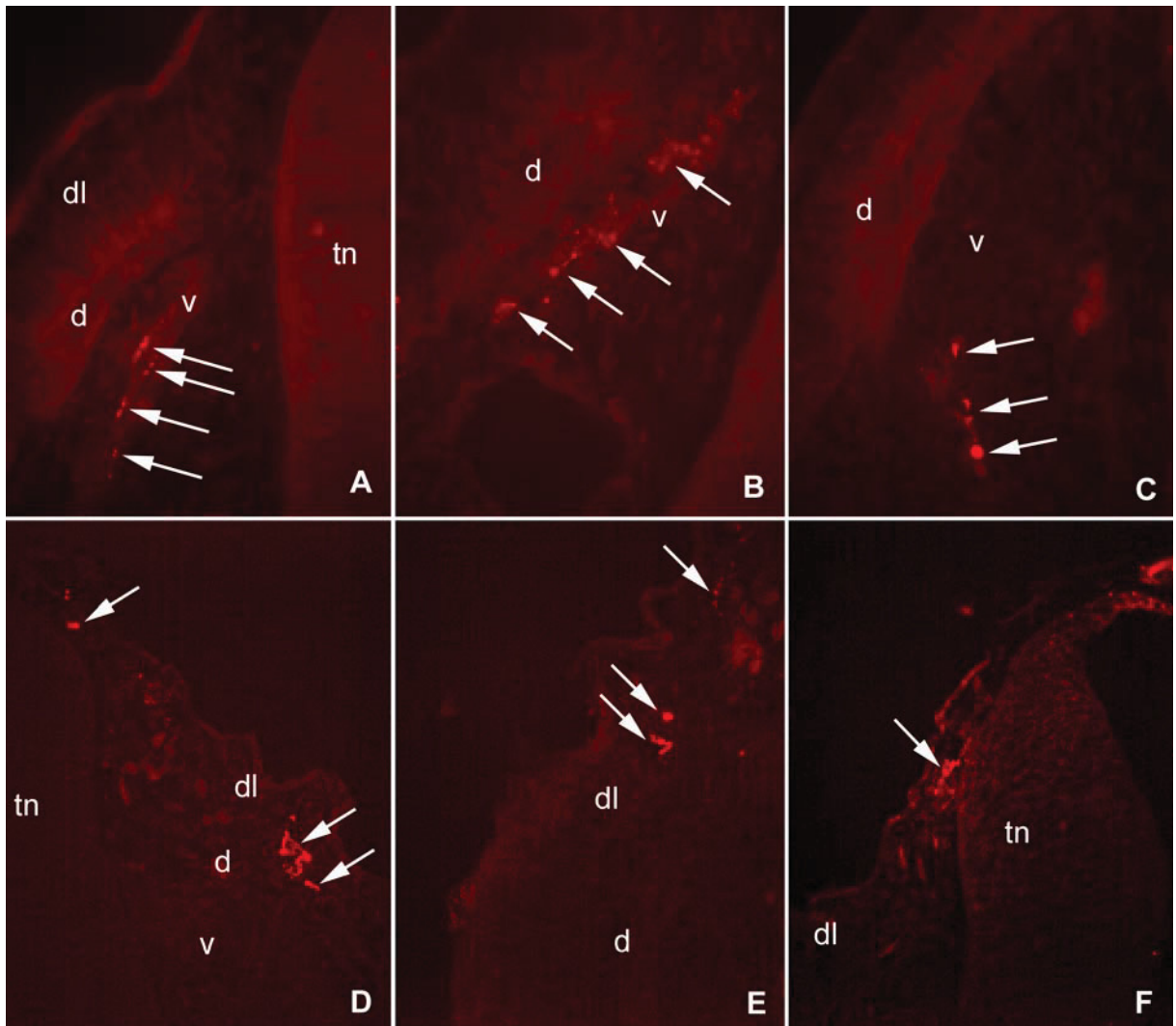


FIGURA 5- Fotomicrografias de fluorescência de cortes de embriões injetados com Dil. A-C) Células coradas pelo Dil ocupando a via ventral de migração (setas). D-F) Células coradas pelo Dil ocupando a via dorsolateral de migração (setas). tn: tubo neural, d: dermatomo, dl: via dorsolateral de migração, v: via ventral de migração, 400X.

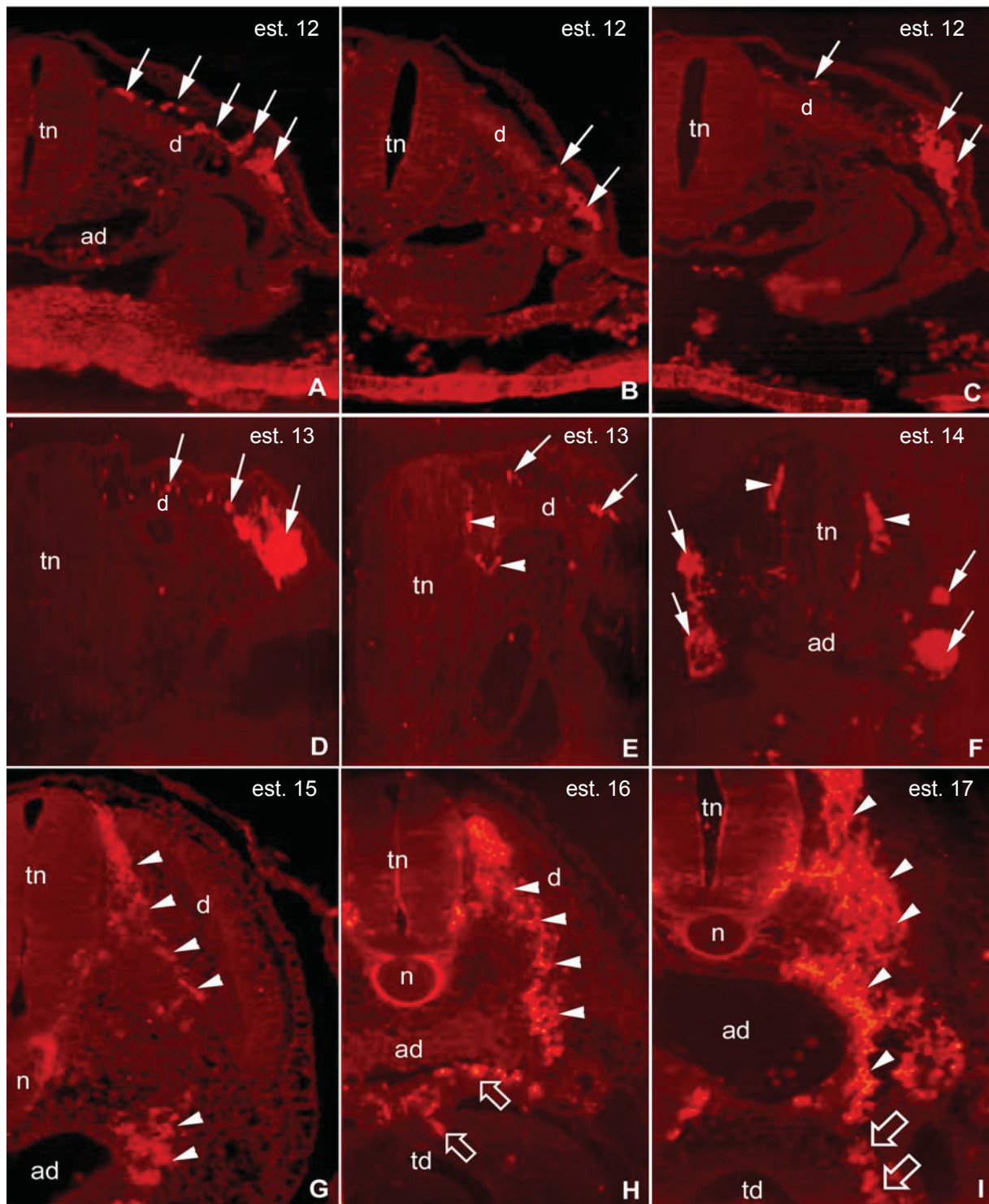


FIGURA 6- Cortes histológicos ao nível vagal de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento imunomarcados com HNK-1. tn: tubo neural, n: notocorda, ad: aorta dorsal, td: tubo digestivo anterior, d: dermatomo, setas: células HNK-1 positivas ocupando a via dorsolateral de migração (crista circumfaringea), cabeças de setas: células HNK-1 positivas ocupando a via ventral de migração, setas abertas: células HNK-1 positivas ocupando a entrada do tubo digestivo anterior (crista entérica), 200X.

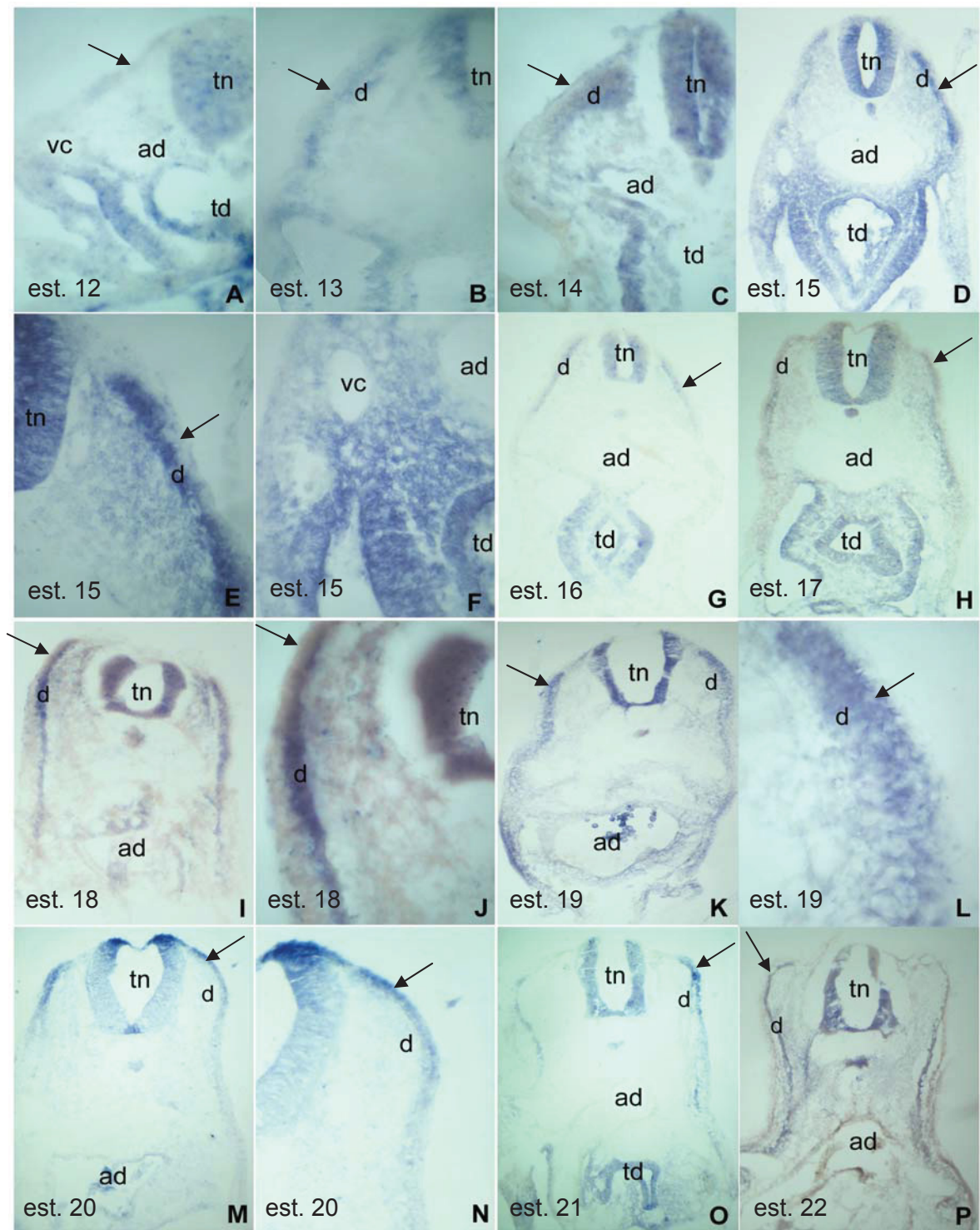


FIGURA 7- Cortes histológicos ao nível vagal de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento imunomarcados para detecção de ligantes ephrina-B. E-F) maior aumento da região do dermátomo e veia cardinal anterior em D, respectivamente. J) maior aumento da região do dermátomo em I. L) maior aumento da região do dermátomo em K. N) maior aumento da região do dermátomo em M. tn: tubo neural, ad: aorta dorsal, d: dermátomo, vc: veia cardinal anterior, td: tubo digestivo anterior, cp: cavidade pericardial, setas: marcação positiva na via dorsolateral de migração. A-C, E, F, J, L e N: 400X. D, G-I, K, M, O e P: 100X.

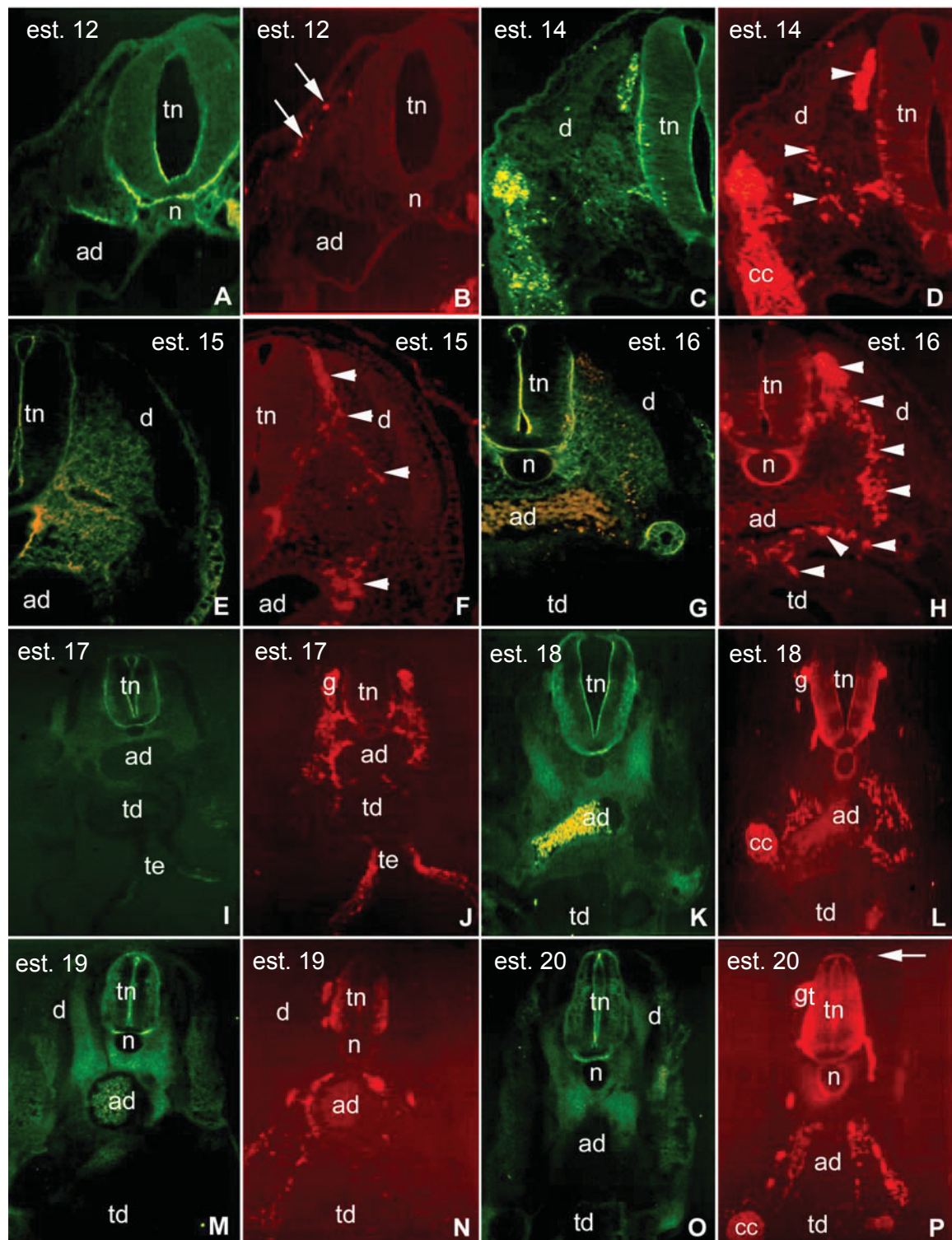


FIGURA 8- Cortes histológicas ao nível vagal de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento imunomarcados com HNK-1 (rodamina) e histoquimicamente marcados com PNA (fluoresceína). tn: tubo neural, n: notocorda, d: dermatomo, ad: aorta dorsal, td: tubo digestivo anterior, te: trato de efluxo cardíaco, gt: gânglio transitório de Frobenius, cc: crista circunfaringeal, setas: células HNK-1 positivas na via dorsolateral de migração, cabeças de setas: células HNK-1 positivas na via ventral de migração. A-H: 200X, I-P: 100X.

3.4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que: 1) Ao nível dos somitos 2 a 5 ocorrem três ondas migratórias distintas, uma dorsolateral precoce, uma ventral e uma dorsolateral tardia. 2) Ligantes ephrina-B estão ausentes dos tecidos que compõem o caminho ventral percorrido pelas células da crista neural da linhagem neuronal neste nível axial, sugerindo que sua ausência pode ser um dos fatores a permitir o acesso desta linhagem celular a regiões ventrais do embrião, como anteriormente descrito (KRULL *et al.*, 1997; WANG & ANDERSON, 1997; SANTIAGO & ERICKSON, 2002). 3) Estes ligantes estão presentes no dermátomo, via dorsolateral, tubo neural e camadas epiteliais do tubo digestivo na região vagal em todos os estágios analisados, corroborando o seu papel estimulatório anteriormente descrito para linhagem melanocítica (SANTIAGO & ERICKSON, 2002), além de sugerir que para a população de crista circunfaringeal estes ligantes também podem atuar como influências estimulatórias à migração. 4) As células da crista neural derivadas do nível dos somitos 2 a 5 também evitam áreas em que glicoconjugados PNA-positivos estão presentes, como anteriormente descrito para os níveis do tronco e sacral (OAKLEY *et al.*, 1994; DE FREITAS *et al.*, 2003). 4) Não são observadas diferenças significativas no padrão de dispersão das células da crista neural entre os quatro somitos analisados.

Ondas migratórias da crista neural vagal

Como já mencionado, ocorrem três ondas migratórias no nível axial vagal (REEDY *et al.*, 1998). Utilizando injeções de corante fluorescente Dil e imunomarcagem de células da crista neural foi possível confirmar este dado e, além disto, descrever os caminhos exatos percorridos pelas células da crista neural e determinar em quais períodos estas ondas migratórias estão acontecendo.

A primeira onda migratória, através do caminho dorsolateral (entre ectoderme e dermátomo), ocorre em embriões injetados entre os estágios 9 e 12, com poucas células observadas seguindo por esta via nos embriões injetados nos estágios 13 e 14. Estas células param sua migração ao alcançar as bordas da veia cardinal

anterior, posicionada ventral à extremidade final do dermatomo. Esta localização corresponde àquela descrita anteriormente para a subpopulação de células da crista neural denominada crista circunfaringeal (KURATANI & KIRBY, 1991). No entanto, em contraste com estudos anteriores, que descrevem a formação da crista circunfaringeal ocorrendo apenas até o nível do somito 3 (KIRBY & WALDO, 1990), aqui é possível observar a formação desta subpopulação até o somito 5. Após o estágio 15, quando já se tem migração através da via ventral, as células da crista circunfaringeal que estão aglomeradas ao redor da veia cardinal anterior se misturam com as de origem ventral, que se localizam ao redor da aorta dorsal e mais tarde também no entorno da faringe. Esta observação corresponde ao descrito anteriormente por KURATANI & KIRBY (1991; 1992).

Em embriões injetados no estágio 10-11 e coletados no estágio 13-14, foi possível observar células da crista neural ocupando tanto a via dorsolateral, como a via ventral de migração. Este dado foi confirmado em cortes imunomarcados com HNK-1, em as células de crista neural foram observadas em ambas as vias de migração em embriões no estágio 13 e 14. Além disto, em embriões no estágio 12 são observadas células da crista neural HNK-1 positivas ocupando exclusivamente a via dorsolateral. Juntos estes resultados indicam que a primeira onda migratória pela via dorsolateral ocorre até o estágio 13-14, e que a segunda onda, pela via ventral, se inicia no estágio 13.

As células da crista neural que seguem a via ventral vão primeiramente através do esclerotomo justamente adjacentes ao dermatomo em todos os somitos analisados (2 a 5). Interessante lembrar que tem sido descrito que as células da crista neural que migram ventralmente ao nível do tronco, preferem usar a lâmina basal do dermatomo como substrato migratório, seguindo numa direção mais ventrolateral (LORING & ERICKSON, 1987; TOSNEY *et al.*, 1994). Enquanto que ao nível sacral (posterior ao somito 28) as células da crista neural seguem por uma trajetória mais diretamente ventral através do esclerótomo, distante do dermatomo (ERICKSON & GOINS, 2000). A seguir observa-se que ao alcançarem o nível da extremidade ventral do dermatomo (ao nível horizontal justamente abaixo da notocorda), as células seguem medialmente e ocupam a região da aorta dorsal e faringe, localizando-se ao redor destas estruturas. Não é possível determinar se as células da crista neural deste nível axial migrando ventralmente ocupam toda a

extensão ântero-posterior de cada somito, pois no presente estudo não foi possível analisar montagens totais de embriões injetados com Dil. Entretanto, anteriormente foi descrito que células da crista neural que migram ventralmente, ao nível dos somitos 2 e 3, seguem apenas através da metade anterior de cada somito, e contribuem para o plexo aórtico e Sistema Nervoso Entérico do tubo digestivo (KURATANI & KIRBY, 1991; NODEN, 1988). Com a imunomarcação pelo HNK-1 é possível perceber que as células da crista neural alcançam a entrada do tubo digestivo no estágio 16, dado que foi similar nos 4 somitos analisados. Ao nível sacral as células da crista neural alcançam a entrada do tubo digestivo no estágio 19 (ERICKSON & GOINS, 2000).

Células que partem do tubo neural do estágio 16 em diante não seguem a via ventral de migração, o que indica que o término da migração por esta via ocorre antes deste estágio. Injeções realizadas em embriões do estágio 16 em diante resultam numa aglomeração de células da crista neural ocupando toda a porção dorsal do embrião e algumas destas células já se localizam na via dorsolateral de migração, caracterizando assim o início da terceira onda migratória. A descrição de que as células da crista neural que partem do tubo neural em estágios mais tardios (20 em diante), seguem a via dorsolateral e são especificadas como melanócitos (REEDY *et al.*, 1998), pode indicar que estas células são melanoblastos, os precursores dos melanócitos, embora não se tenha realizado a imunomarcação específica para a linhagem.

Parece existir uma janela de tempo entre as segunda e terceira ondas migratórias, que não é possível observar entre a primeira e segunda ondas. Indicativa disto, é a observação de uma sobreposição das duas primeiras ondas migratórias neste nível axial. Em embriões coletados nos estágios 13 e 14 após a injeção ou imunomarcados por HNK-1 nestes mesmos estágios, é possível observar células da crista neural ocupando tanto a via dorsolateral como a via ventral. Enquanto que em embriões injetados do estágio 16 em diante células da crista neural são observadas ocupando exclusivamente a via dorsolateral. Na região do tronco foi descrito um intervalo de 24 horas entre a migração ventral de precursores neuronais e dorsolateral de melanoblastos (HULLEY *et al.*, 1991). Na região vaginal foram observados anteriormente melanoblastos (imunomarcados com soro Smyth line) ocupando o aspecto dorsal do tubo neural a partir do estágio 20, e estes só

iniciaram a invasão da via dorsolateral no estágio 21-22 (REEDY *et al.*, 1998). Estes dados corroboram os observados no presente estudo, embora não se tenha realizado a imunomarcacão com o soro Smyth line apropriado para reconhecimento de melanoblastos. Células coradas com Dil são observadas ocupando estas regiões em embriões coletados nos estágios 20 a 22. No entanto, em embriões coletados nos estágios 18-19 após a injeção de Dil, já se observam células aglomeradas abaixo da ectoderme exatamente dorsal ao tubo neural, ocupando a região denominada “migration staging area” (MSA).

Não é possível observar diferenças entre os somitos 2 a 5 no padrão temporal e espacial de distribuição das células da crista neural. Elas se distribuem num padrão que é característico do nível vagal, com suas três ondas migratórias. FERGUSON & GRAHAM (2004) descrevem que a partir do somito 4 as células da crista neural apresentam comportamento migratório correspondente ao padrão da região do tronco. Porém, analisaram somente a migração ventral, sem considerar as diferentes ondas migratórias que muito anteriormente já haviam sido descritas e posteriormente confirmadas por muitos autores, inclusive no presente trabalho. Descrevem que ao nível dos somitos 2 e 3 não há migração ventral, e que estes somitos seriam desprovidos de células da crista neural. Isto contradiz a literatura corrente. E, além disto, no presente trabalho é possível verificar que existem as três ondas ao nível dos somitos 2 e 3.

Outro ponto importante seria analisar os embriões inteiros após a injeção de Dil. Infelizmente no presente trabalho não foi possível realizar esta análise, pois para isto seria necessária a utilização de um estereomicroscópio com iluminação para epifluorescência, equipamento não disponível.

Influências ambientais e a migração da crista neural vagal

Muitas influências ambientais, atuando como promotoras ou inibidoras da migração das células da crista neural, vêm sendo investigadas por desempenhar importantes papéis no direcionamento e padronização da crista neural. A presença de ligantes ephrina-B em células que compõem os caminhos percorridos por células da crista neural já foi associada tanto com a inibição como com o estímulo da migração. Para a linhagem neuronal da crista neural, aquela que migra

ventralmente, eles foram descritos atuar como inibidores da migração (KRULL *et al.*, 1997; WANG & ANDERSON, 1997; SANTIAGO & ERICKSON, 2002). Já com a linhagem melanocítica, que migra dorsolateralmente, a relação é diferente, sendo os ligantes ephrina-B descritos como estimuladores da migração (SANTIAGO & ERICKSON, 2002). Outras moléculas estão relacionadas exclusivamente à inibição da migração da crista neural, sendo um exemplo a presença de glicoconjugados PNA-positivos em tecidos que são evitados por células da crista neural em migração (OAKLEY *et al.*, 1994; DE FREITAS *et al.*, 2003). No presente trabalho a distribuição de ligantes ephrina-B e glicoconjugados PNA-positivos foi analisada durante as três ondas migratórias que ocorrem na região vagal.

A presença de ligantes ephrina-B é constante no dermatomo, via dorsolateral, tubo neural e camadas epiteliais do tubo digestivo (desde o estágio 12 até o 22). Ao nível vagal os tecidos que compõem a via ventral de migração, seguido por células de crista da linhagem neuronal, são negativos para ligantes ephrina-B, o que corrobora o seu papel inibitório já descrito para esta linhagem celular (KRULL *et al.*, 1997; WANG & ANDERSON, 1997; SANTIAGO & ERICKSON, 2002). Um dado interessante é que somente no estágio 15 é observada marcação positiva para ligantes ephrina-B no mesênquima imediatamente ventral à aorta dorsal e lateroventral à veia cardinal anterior, que corresponde à entrada do tubo digestivo. Esta positividade para ligantes ephrina-B desaparece no estágio seguinte (16), que coincide com o período de entrada das células da crista neural entérica que vão inervar o tubo digestivo.

A área que corresponde à via dorsolateral é positiva para ligantes ephrina-B desde o estágio 12 até o 22 (último analisado), reforçando a sugestão de seu papel estimulatório para melanoblastos descrito anteriormente (SANTIAGO & ERICKSON, 2002). Já para as células da primeira onda migratória, a crista circunfaringeal, como ainda não foram realizados experimentos que testem qual a influência que estes ligantes apresentam sobre sua migração, pode-se apenas sugerir que os ligantes ephrina-B possam atuar como influência estimulatória, ou que não apresentem um efeito direto sobre seu comportamento migratório, o que é muito pouco provável, já que eles estão presentes durante o intervalo de tempo em que esta onda está acontecendo.

Seria necessária a realização de experimentos que testem o efeito da perturbação da interação de receptores EphB/ephrina-B sobre a migração das células da crista neural vagal, como foi realizado para o nível do tronco durante a migração dos melanoblastos descrito no Capítulo 2 deste trabalho, para verificar com mais precisão seu papel no comportamento migratório destas células, principalmente durante a primeira onda.

Nos estágios 12 a 14 a presença de glicoconjugados PNA-positivos é detectada exclusivamente no esclerótomo medial, justamente adjacente a notocorda, enquanto que a via dorsolateral é negativa. Nestes estágios observam-se células de crista ocupando a via dorsolateral de migração e a partir do estágio 13 as células também ocupam a via ventral. Nos estágios 15 e 16, a presença de glicoconjugados PNA-positivos é detectada na via dorsolateral, além da observada na porção medial do esclerótomo. Nestes estágios não é observada migração pela via dorsolateral, as células de crista estão ocupando a via ventral. Interessante salientar que estas células ocupam uma região adjacente ao dermatomo, onde a marcação para glicoconjugados é menos intensa que na porção medial do esclerótomo. A partir do estágio 18 até 22 a via dorsolateral é negativa para glicoconjugados PNA-positivos e a marcação positiva observada no esclerótomo agora abrange uma área maior, chegando até próximo do dermatomo. Coincidentemente, as células neste período não invadem a via ventral e passam a ocupar primeiro a porção dorsal do embrião e em seguida a área inicial da via dorsolateral.

A ausência de glicoconjugados PNA-positivos em áreas que correspondem às vias dorsolateral e ventral apresentou-se em diferentes intervalos de tempo, que são correspondentes aos períodos em que a migração das células da crista neural está ocorrendo por uma ou outra via. Isto sugere que estas moléculas possam estar apresentando na região vagal, o mesmo papel inibitório à migração da crista neural já descrito nas regiões do tronco e sacral, tanto para linhagens que migram dorsolateralmente como para aquelas que migram ventralmente (OAKLEY *et al.*, 1994; DE FREITAS *et al.*, 2003).

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho podemos elaborar algumas considerações finais. Primeiramente com relação aos padrões de expressão de ligantes ephrina-B, fibronectina e glicoconjugados PNA-positivos observados para a região do tronco durante a dispersão de melanoblastos em embriões de galinhas despigmentadas (Leghorn) e hiperpigmentadas (Sedosa Japonesa).

Os caminhos atípicos seguidos por melanoblastos em embriões de galinha Sedosa são constituídos por tecidos que expressam ligantes ephrina-B. Além disto, os embriões de Sedosa apresentam uma distribuição ventral destes ligantes muito mais ampla que embriões de Leghorn. Estes dados corroboram o papel estimulatório à migração de melanoblastos demonstrado anteriormente por ligantes ephrina-B. Adicionalmente, a observação da presença de fibronectina em caminhos ventrais correlaciona-se com a dispersão aumentada de melanoblastos em embriões de Sedosa. A presença de glicoconjugados PNA-positivos apresenta brechas nas entradas para regiões médioventrais em embriões de Sedosa. Já em embriões de Leghorn não existem estas brechas. Isto corrobora o papel inibitório à migração da crista anteriormente descrito para tecidos que apresentam estes glicoconjugados. E finalmente, o padrão de distribuição destas moléculas exibido por embriões da raça Sedosa corresponde com sua dispersão atípica de melanoblastos, sugerindo um papel combinatório entre ephrinas-B e glicoconjugados PNA-positivos. A perturbação da interação receptor Eph-B/ephrina-B causa uma alteração na migração de melanoblastos em ambas as raças, pois estes não seguem sua migração através do caminho dorsolateral. Enquanto que, com o bloqueio de glicoconjugados PNA-positivos não se observa mudança no comportamento migratório dos melanoblastos.

Outras moléculas podem estar regulando a migração de melanoblastos em embriões de Sedosa. Endotelina 3 tem sido sugerida como atrativa para melanoblastos em embriões de camundongo. Como esta molécula poderia estar atuando em embriões de Sedosa seu padrão de expressão é um ponto importante e que começará a ser investigado por nossos laboratórios. A ave Sedosa Japonesa é

um modelo muito rico para estudos sobre os mecanismos moleculares que controlam a padronização da pigmentação.

Os resultados com relação ao padrão de distribuição das células da crista neural ao nível dos quatro primeiros somitos permanentes confirmam alguns dados anteriormente descritos, além de contribuir para conhecimento do padrão característico de distribuição da crista neural vagal. Foi possível confirmar que as células da crista neural neste nível axial se dispersam em três ondas migratórias distintas. Uma primeira onda dorsolateral ocorre entre os estágios 9 e 14, uma ventral entre os estágios 13 e 15, e uma dorsolateral tardia que se inicia no estágio 20. Não são observadas diferenças significativas no padrão de dispersão das células da crista neural entre os quatro somitos analisados (2 a 5). Isto representa informação importante, pois difere de descrição anterior, em que foi considerado que a partir do somito 4 as células da crista neural passam a ser dispersar num padrão que corresponde ao observado no nível do tronco (FERGUSON & GRAHAM, 2004).

Por isso o mapeamento precisa continuar sendo realizado em somitos caudais ao 5, para determinar onde se situa o ponto exato de transição entre a região vagal e do tronco, em que as células deixam de migrar em 3 ondas e passa a se distribuir em 2 ondas como descrito para a região do tronco ao nível do broto da asa. A análise de montagens totais de embriões imunomarcados ou injetados com Dil pode trazer grande contribuição para a definição de rotas migratórias. De grande valia é também a vídeo-microscopia que permite seguir o trajeto das células em tempo real. Interações com outros laboratórios serão levadas a efeito no futuro, para a obtenção destes dados.

Da análise da distribuição de ligantes ephrina-B na região vagal foi possível observar que eles estão ausentes da via ventral de migração, percorrida pelas células da crista neural da linhagem neuronal. Mas sua presença no caminho dorsolateral é constante desde o estágio 12 até o 22. Que efeito estes ligantes apresentam sobre a migração das células da crista circunfaringeal é uma questão que deve ser testada, já que estão presentes durante o período em que estas células estão migrando. Já para a linhagem melanocítica, que migra mais tardiamente (após estágio 20; REEDY *et al.*, 1998) eles foram descritos como influências que estimulam a dispersão (SANTIAGO & ERICKSON, 2002), e aqui foi possível verificar sua presença na via dorsolateral em estágios que correspondem

ao início da migração de melanoblastos, sugerindo novamente seu papel estimulatório. Análise da distribuição destes ligantes com uso de hibridização *in situ* permitirá detecção mais precisa de sua presença e localização, para alcançar opinião definitiva sobre sua possível influência no comportamento da crista neural vagal. Estamos já realizando os experimentos-piloto para obtenção destes dados.

Com a marcação de glicoconjugados PNA-positivos ao nível vagal foi possível constatar que as células da crista neural derivadas deste nível axial também evitam áreas em que glicoconjugados PNA-positivos estão presentes, como anteriormente descrito para os níveis do tronco e sacral (OAKLEY *et al.*, 1994; DE FREITAS *et al.*, 2003).

Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível confirmar o papel combinatório de ligantes ephrina-B e glicoconjugados PNA-positivos no direcionamento das células da crista neural. Além disto, foi possível verificar que as células da crista neural ao nível dos somitos 2 a 5 se dispersam em três ondas migratórias, indicando que o limite entre a crista neural da região vagal e do tronco reside em somito posterior ao somito 5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEAUVAIS, A. *et al.* Changes in the fibronectin-specific integrin expression pattern modify the migratory behavior of sarcoma S180 cells in vitro and in embryonic environment. **J. Cell Biol.**, v. 128, n. 4, p. 699-713, 1995.
- BOOT, M. J. *et al.* The myth of ventrally emigrating neural tube (VENT) cells and their contribution to the developing cardiovascular system. **Anat. Embryol.**, v. 206, p. 327-333, 2003.
- BRONNER-FRASER, M. Alterations in neural crest migration by a monoclonal antibody that affects cell adhesion. **J. Cell Biol.**, v. 101, p. 610-617, 1985.
- BRONNER-FRASER, M. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. **Dev. Biol.**, v. 115, p. 44-55, 1986.
- BRONNER-FRASER, M. Neural crest cell formation and migration in developing embryo. **FASEB J.**, v. 8, p. 609-706, 1994.
- BRONNER-FRASER, M. Methods in avian embryology (Methods in Cell Biology), v. 51. London: **Academic Press**, 1996.
- BROWN, C. B. *et al.* PlexinA2 and semaphorin signaling during cardiac neural crest development. **Development**, v. 128, p. 3071-3080, 2001.
- BURNS, A. J.; CHAMPEVAL, D.; LE DOUARIN, N. M. Sacral neural crest cells colonise aganglionic hindgut *in vivo* fail to compensate for lack of enteric ganglia. **Dev. Biol.**, v. 219, p. 30-43, 2000.
- BURNS, A. J.; LE DOUARIN, N. M. The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. **Development**, v. 125, p. 4335-4347, 1998.
- CANTEMIR, V. *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression during cardiac neural crest cell migration and its role in ProMMP-2 activation. **Dev. Dyn.**, v. 231, p. 709-719, 2004.
- CARLSON, B. M. Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento. 1ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1996.
- CHAMBERS, D.; MCGONNELL, I. M. Neural crest: facing the facts of head development. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 8, p. 381-384, 2002.
- CIMENT, G. & WESTON, J. A. Enteric neurogenesis by neural crest-derived branchial arch mesenchymal cells. **Nature**, v. 305, n. 5933, p. 424-427, 1983.

CIMENT, G.; WESTON, J. A. Segregation of developmental abilities in neural-crest-derived cells: identification of partially restricted intermediate cell types in the branchial arches of avian embryos. **Dev. Biol.**, v.111, p. 73-83, 1985.

CORNELL, R. A.; EISEN J. S. Notch in the pathway: the roles of Notch signaling in neural crest development. **Sem. Cell Dev. Biol.**, v. 16, p. 663-672, 2005.

COULY, G. *et al.* Interactions between Hox-negative cephalic neural crest cells and the foregut endoderm in patterning the facial skeleton in the vertebrate head. **Development**, v. 129, p. 1061-1073, 2002.

CREUZET, S.; COULY, G.; LE DOUARIN, N. M. Patterning the neural crest derivatives during development of the vertebrate head: insights from avian studies. **J. Anat.**, v. 207, p. 447-459, 2005.

DE BELLARD, M. E.; RAO, Y.; BRONNER-FRASER, M. Dual function of slit2 in repulsion and enhanced migration of trunk, but not vagal, neural crest cells. **J. Cell Biol.**, v. 162, p. 269-279, 2003.

DE FREITAS, P. F.; FERREIRA, F. F.; FARACO, C. D. PNA-positive glycoconjugates are negatively correlated with the access of neural crest cells to the gut in chicken embryos. **Anat. Rec. Part A**, v. 273A, p. 705-713, 2003.

DELANNET, M. *et al.* Specific roles of the $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 5$ integrins in avian neural crest cell adhesion and migration on vitronectin. **Development**, v. 120, p. 2687-2702, 1994.

DORSKY, R. I.; MOON, R. T.; RAIBLE, D. W. Environmental signals and cell fate specification in premigratory neural crest. **BioEssays**, v. 22, p. 708-716, 2000.

DUBAND, J. L. *et al.* Neural crest cell locomotion induced by antibodies to $\beta 1$ integrins: a tool for studying the roles of substratum molecular avidity and density in migration. **J. Cell Sci.**, v. 98, p. 517-532, 1991.

EPH NOMENCLATURE AND COMMITTEE: Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. **Cell**, v. 90, p. 403-404, 1997.

EPPELLEIN, H. H.; HALFTER, W.; TUCKER, R. P. The distribution of fibronectin and tenascin along migratory pathways of the neural crest in the trunk of amphibian embryos. **Development**, v. 103, p. 743-756, 1998.

EPSTEIN, M. L. *et al.* Mapping the origin of the avian enteric nervous system with a retroviral marker. **Dev. Dyn.**, v. 201, p. 236-244, 1994.

ERICKSON, C. A. Control of pathfinding by the avian trunk neural crest. **Development**, v. 103, p. 63-80, 1988. Supplement.

ERICKSON, C. A. Morphogenesis of the avian trunk neural crest: use of morphological techniques in elucidating the process. **Mic. Res. Tech.**, v. 26, p. 329-351, 1993.

ERICKSON, C. A.; DUONG, T. D.; TOSNEY, K. W. Descriptive and experimental analysis of the dispersion of neural crest cells along the dorsolateral path and their entry into ectoderm in the chick embryo. **Dev. Biol.**, v. 151, p. 251-272, 1992.

ERICKSON, C. A.; GOINS, T. L. Avian neural crest can migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanocytes. **Development**, v. 121, p. 915-924, 1995.

ERICKSON, C. A.; GOINS, T. L. Sacral neural crest cell migration to the gut is dependent upon the migratory environment and not cell-autonomous migratory properties. **Dev. Biol.**, v. 219, p. 79-97, 2000.

ERICKSON, C. A.; PERRIS, R. The role of cell-cell and cell-matrix interactions in the morphogenesis of the neural crest. **Dev. Biol.**, v. 156, p. 60-74, 1993.

ERICKSON, C. A.; REEDY, M. V. Neural crest development: The interplay between morphogenesis and cell differentiation. **Curr. Top. Dev. Biol.**, v. 40, p. 177-209, 1998.

ERICKSON, C. A.; TOSNEY, K. W.; WESTON, J. A. Analysis of migratory behavior of neural crest and fibroblastic cells in embryonic tissues. **Dev. Biol.**, v. 77, p. 142-156, 1980.

ERICKSON, C. A.; TURLEY, E. A. Substrata formed by combinations of extracellular matrix components alter neural crest cell motility *in vitro*. **J. Cell Sci.**, v. 61, p. 299-323, 1983.

FARACO, C. D. *et al.* Hyperpigmentation in the Silkie fowl correlates with abnormal migration of fate-restricted melanoblasts and loss of environmental barrier molecules. **Dev. Dyn.**, v. 220, n. 3, p. 212-225, 2001.

FERGUSON, C. A.; GRAHAM, A. Redefining the head-trunk interface for the neural crest. **Dev. Biol.**, v. 269, p. 70-80, 2004.

FRISÉN, J.; HOLMBERG, J.; BARBACID, M. Ephrins and their Eph receptors: multitasking directors of embryonic development. **The EMBO J.**, v. 18, n. 19, p. 5159-5165, 1999.

GASSER, R. F. Evidence that some events of mammalian embryogenesis can result from differential growth, making migration unnecessary. **Anat. Rec. Part B**, v. 289B, p. 53-63, 2006.

GRAHAM, A.; HEYMAN, I.; LUMSDEN, A. Even-numbered rhombomeres control the apoptotic elimination of neural crest cells from odd-numbered rhombomeres in the chick hindbrain. **Development**, v. 119, p. 233-245, 1993.

GERSHON, M. D.; CHALAZONITIS, A.; ROTHMAN, T. P. From neural crest to bowel: development of the enteric nervous system. **J. Neurobiol.**, v. 24, n. 2, p. 199-214, 1993.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **J. Morphology**, v. 88, p. 49-92, 1951.

HOLMBERG, J.; CLARKE, D.L.; FRISÉN, J. Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. **Nature**, v. 408, p. 203-206, 2000.

HONG, C. S.; SAINT-JEANNET, J. P. Sox proteins and neural crest development. **Sem. Cell Dev. Biol.**, v. 16, p. 694-703, 2005.

HULLEY, P. A.; STANDER, C. S.; KIDSON, S. H. Terminal migration and early differentiation of melanocytes in embrionic chick skin. **Dev. Biol.**, v. 145, p. 182-194, 1991.

ISHII, M. *et al.* Combined deficiencies of *Msx1* and *Msx2* cause impaired patterning and survival of the cranial neural crest. **Development**, v. 132, p. 4937-4950, 2005.

ITO K. & SIEBER-BLUM, M. Pluripotent and developmentally restricted neural-crest-derived cells in posterior visceral arches. **Dev. Biol.**, v. 156, p. 191-200, 1993.

JIN, E. J. *et al.* Wnt and BMP sinaling govern lineage segregation of melanocytes in the avian embryo. **Dev. Biol.**, v. 233, p. 22-37, 2001.

KERR, R. S. E.; NEWGREEN, D. F. Isolation and characterization of chondroitin sulfate proteoglycans from embryonic quail that influence neural crest cell behavior. **Dev. Biol.**, v.192, p. 108-124, 1997.

KIRBY, M. L.; WALDO, K. L. Role of the neural crest in congenital heart disease. **Circulation**, v. 82, p. 332-340, 1990.

KOS, R. *et al.* The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. **Development**, v. 128, p. 1467-1479, 2001.

KROTOSKI, D. M.; DOMINGO, C.; BRONNER-FRASER, M. Distribution of a putative cell surface receptor for fibronectin and laminin in the avian embryo. **J. Cell Biol.**, v. 103, p. 1061-1071, 1986.

KRULL, C. E. *et al.* Interactions of eph-related receptors and ligands comfer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. **Cur. Biol**, v. 7, p. 571-580, 1997.

KUKLEINSKI, J. Uber das vorkommen und die verteilung de pigmentes in den organen und gewebe bei japanischen seiden huhnern. **Arch Micro Anat Entwick**, v. 87, p. 1-37, 1915.

KULLANDER, K.; KLEIN, R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. **Mol. Cell Biol.**, v. 3, p. 475-486, 2002.

KULESA, P. M. & FRASER, S. E. Neural crest cell dynamics revealed by time-lapse video microscopy of whole embryo chick explants cultures. **Dev. Biol.**, v. 204, p. 327-344, 1998.

KULESA, P. M. & FRASER, S. E. In ovo time-lapse analysis of chick hindbrain neural crest cell migration shows cell interactions during migration to the branchial arches. **Development**, v. 127, p. 1161-1172, 2000.

KURATANI, S. C. Spatial distribution of postotic crest cells defines the head/trunk interface of the vertebrate body: embryological interpretation of peripheral nerve morphology and evolution of the vertebrate head. **Anat. Embryol.**, v. 195, p. 1-13, 1997.

KURATANI, S. C. & KIRBY, M. L. Initial migration and distribution of the cardiac neural crest in the avian embryo: an introduction to the concept of the circumpharyngeal crest. **Am. J. Anat.**, v. 191, p. 215-227, 1991.

KURATANI, S. C.; KIRBY, M. L. Migration and distribution of circumpharyngeal crest cells in the chick embryo. **Anat. Rec.**, v. 234, p. 263-280, 1992.

LAHAV, R. *et al.* Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 3892-3897, 1996.

LALLIER, T.; BRONNER-FRASER, M. Inhibition of neural crest cell attachment by integrin antisense oligonucleotides. **Science**, v. 259, p. 692-695, 1993.

LECOIN, L. *et al.* Steel and c-kit in the development of avian melanocytes: a study of normally pigmented birds and of the hyperpigmented mutant Silky fowl. **Dev. Dyn.**, v. 203, p. 106-118, 1995.

LE DOUARIN, N. M. The neural crest. Cambridge: **Cambridge Univ. Press**, 1982.

LE DOUARIN, N. M. Embryonic neural chimaeras in the study of brain development. **Trends Neurosci.**, v. 16, p. 64-72, 1993.

LE DOUARIN, N. M.; KALCHEIM, C. The neural crest. 2nd ed. Cambridge: **Cambridge Univ. Press**, 1999.

LE DOUARIN, N. M.; TEILLET, M. A. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v. 30, n. 1, p. 31-48, 1973.

LE DOUARIN, N. M.; TEILLET, M. A. Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neurectodermal

mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. **Dev. Biol.**, v. 41, p. 162-184, 1974.

LO, C. W.; WALDO, K. L.; KIRBY, M. L. Gap junction communication and the modulation of cardiac neural crest cells. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 9, p. 63-69, 1999.

LORING, J. F.; ERICKSON, C. A. Neural crest cell migratory pathways in the trunk of the chick embryo. **Dev. Biol.**, v. 121, p. 220-236, 1987.

LUMSDEN, A.; SPRAWSON, N.; GRAHAM, A. Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. **Development**, v. 113, p. 1281-1291, 1991.

LUO, Y. *et al.* N-cadherin is required for neural crest remodeling of the cardiac outflow tract. **Dev. Biol.**, doi:10.1016/j.ydbio.2006.09.003 (in press), 2006.

MACKIE, E. J. *et al.* The distribution of tenascin coincides with pathways of neural crest cell migration. **Development**, v. 102, p. 237-250, 1988.

MIYAGAWA-TOMITA, S. *et al.* Temporospatial study of the migration and distribution of cardiac neural crest in quail-chick chimeras. **Am. J. Anat.**, v. 192, p. 79-88, 1991.

MONIER-GAVELLE, F.; DUBAND, J. L. Cross talk between adhesion molecules: Control of N-cadherin activity by intracellular signals elicited by $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins in migrating neural crest cells. **J. Cell Biol.**, v. 137, n. 7, p. 1663-1681, 1997.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Embriologia Clínica. 7ª ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2004.

NAKAGAWA, S.; TAKEICHI, M. Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. **Development**, v. 121, p. 1321-1332, 1995.

NAKAMOTO, M. Eph receptors and ephrins. **Int. J. Bioch. Cell Biol.**, v. 32, p. 7-12, 2000.

NATAF, V. *et al.* Endothelin-B receptor is expressed by neural crest cells in the avian embryo. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 9645-9650, 1996.

NEWGREEN, D. F.; SCHEEL, M.; KASTNER, V. Morphogenesis of sclerotome and neural crest in avian embryos: *in vivo* and *in vitro* studies on the role of notochordal extracellular material. **Cell Tissue Res.**, v. 224, p. 299-313, 1986.

NIEDERREITHER, K. *et al.* The regional pattern of retinoic acid synthesis by RALDH2 is essential for the development of posterior pharyngeal arches and the enteric nervous system. **Development**, v. 130, p. 2525-2534, 2003.

NODEN, D. M. The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. **Dev. Biol.**, v. 96, p. 144-165, 1983.

NODEN, D. M. Interactions and fates of avian craniofacial mesenchyme. **Development**, v. 103, p. 121-140, 1988, Supplement.

OAKLEY, R. A. *et al.* Glycoconjugates mark a transient barrier to neural crest migration in the chicken embryo. **Development**, v. 120, p. 103-114, 1994.

ORSULIC, S.; KEMLER, R. Expression of Eph receptors and ephrins is differentially regulated by E-cadherin. **J. Cell Sci.**, v. 113, p. 1793-1802, 2000.

PATTEN, B. M. Human Embryology. 2nd ed. London: **J & A Churchill, Ltd.**, 1953.

PERISSINOTTO, D. *et al.* Avian neural crest cell migration is diversely regulated by the two major hyaluronan-binding proteoglycans PG-M/versican and aggrecan. **Development**, v. 127, p. 2823-2842, 2000.

PETERS-VAN DER SANDEN, M. J. H. *et al.* Ablation of various regions within the avian vagal neural crest has differential effects on ganglion formation in the fore-, mid- and hindgut. **Dev. Dyn.**, v. 196, p. 183-194, 1993.

PETTWAY, Z. *et al.* Age-dependent inhibition of neural crest migration by the notochord correlates with alterations in the S103L chondroitin sulfate proteoglycan. **Exp. Cell Res.**, v. 225, p. 195-206, 1996.

POMERANZ, H. D.; ROTHMAN, T. P.; GERSHON, M. D. Colonization of the post-umbilical bowel by cells derived from the sacral neural crest: direct tracing of cell migration using a non-intercalating probe and a replication-deficient retrovirus. **Development**, v. 111, p. 647-655, 1991.

REEDY, M. V.; FARACO, C. D.; ERICKSON, C. A. Specification and migration of melanoblasts at the vagal level and in hyperpigmented Silkie chickens. **Dev. Biol.**, v. 213, p. 476-485, 1998.

ROTHMAN, T. P. *et al.* Developmental potential neural crest-derived cells migrating from segments of developing quail bowel back-grafted into younger chick host embryos. **Development**, v. 109, p. 411-423, 1990.

ROTHMAN, T. P. *et al.* Colonization of the bowel by neural crest-derived cells re-migrating from foregut backtransplanted to vagal or sacral regions of host embryos. **Dev. Dyn.**, v. 196, p. 217-233, 1993.

RUNYAN, R. B.; MAXWELL, G. D.; SHUR, B. D. Evidence for a novel enzymatic mechanism of neural crest cell migration on extracellular glycoconjugate matrices. **J. Cell Biol.**, v. 102, p. 432-441, 1986.

SALDIVAR, J. R. *et al.* Dorsal hindbrain ablation results in rerouting of neural crest migration and changes in gene expression, but normal hyoid development. **Development**, v. 124, p. 2729-2739, 1997.

SANTIAGO, A.; ERICKSON, C. A. Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration. **Development**, v. 129, p. 3621- 3632, 2002.

SERBEDZIJA, G. N.; BRONNER-FRASER, M.; FRASER, E. S. A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration. **Development**, v. 106, p. 809-816, 1989.

SERBEDZIJA, G. N. *et al.* Vital dye labelling demonstrates a sacral neural crest contribution to the enteric nervous system of chick and mouse embryos. **Development**, v. 111, p. 857-866, 1991.

SHUR, B. D. Cell surface glycosyltransferase activities during normal and mutant (T/T) mesenchyme migration. **Dev. Biol.**, v. 91, p. 149-162, 1982.

SMOAK, W. *et al.* Sonic hedgehog is required for cardiac outflow tract and neural crest cell development. **Dev. Biol.**, v. 283, p. 357-372, 2005.

SOHAL, G. S. *et al.* Emigration of neuroepithelial cells from the hindbrain neural tube in the chick embryo. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 16, p. 477-481, 1998.

STANCHINA, L. *et al.* Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development. **Dev. Biol.**, v. 295, p. 232-249, 2006.

STOLLER, J. Z.; EPSTEIN, J. A. Cardiac Neural crest. **Sem. Cell Dev. Biol.**, v. 16, p. 704-715, 2005.

SUZUKI, H. R.; KIRBY, M. L. Absence of neural crest cell regeneration from the postotic neural tube. **Dev. Biol.**, v. 184, p. 222-233, 1997.

TOSNEY, K. W. The segregation and early migration of cranial neural crest cells in the avian embryo. **Dev. Biol.**, v. 89, p. 13-24, 1982.

TOSNEY, K. W.; DEHNBOSTEL, D. B.; ERICKSON, C. A. Neural crest cells prefer the myotome's basal lamina over the sclerotome as a substratum. **Dev. Biol.**, v. 163, p. 389-406, 1994.

TUCKER, G. C.; CIMENT, G.; THIERY, J. P. Pathways of avian neural crest cell migration in the developing gut. **Dev. Biol.**, v. 116, p. 439-450, 1986.

WALDO, K.; KUMISKI, D.; KIRBY, M. L. Cardiac neural crest is essential for the persistence rather than the formation of an arch artery. **Dev. Dyn.**, v. 205, p. 281-292, 1996.

WALL, N. A. & HOGAN, B. L. M. Expression of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), fibroblast growth factor-8 (FGF-8) and

sonic hedgehog (SHH) during branchial arch development in the chick. **Mech. Dev.**, v. 53, p. 383-392, 1995.

WANG, H. U.; ANDERSON, D. J. Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. **Neuron**, v. 18, p. 383-396, 1997.

WOLPERT, L. *et al.* Princípios de Biologia do Desenvolvimento. Porto Alegre: **Artmed**, 2000.